

Aus der Augenklinik und Poliklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Siegfried Priglinger

Immunhistochemische Differenzierung melanozytärer Bindehauttumoren

Dissertation
zur Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Ulrike Barbara Grenot, geb. Reime
aus
Neuss
2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Elisabeth Meßmer

Mitberichterstatter: PD Dr. Ulrich Schaller
Prof. Dr. Carola Berking
Prof. Dr. Anselm Kampik

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 15.11.2018

Für meine Mutter

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
1.	Die Bindehaut	1
2.	Melanozytäre Läsionen der Bindehaut	2
2.1.	Bindehautnaevi	3
2.1.1.	Klinisches Erscheinungsbild	3
2.1.2.	Histopathologisches Erscheinungsbild	4
2.1.2.1.	Junktionaler Bindehautnaevus	4
2.1.2.2.	Compoundnaevus der Bindehaut	5
2.1.2.3.	Subepithelialer Bindehautnaevus	6
2.2.	Primär erworbene Melanose	7
2.2.1.	Klinisches Erscheinungsbild	7
2.2.2.	Histopathologisches Erscheinungsbild	8
2.2.2.1.	PAM ohne Atypie	8
2.2.2.2.	PAM mit Atypie	9
2.2.2.3.	Histopathologische Merkmale mit hohem Risiko der Progression zum invasiven malignen Melanom	10
2.3.	Das maligne Melanom der Bindehaut	12
2.3.1.	Klinisches Erscheinungsbild	13
2.3.2.	Histopathologisches Erscheinungsbild	13
2.3.3.	Borderline-Läsionen	15
II.	ZIELE DER ARBEIT	16
III.	MATERIAL UND METHODEN	17
1.	Patientengut	17
2.	Antikörper	18
3.	Histologische Aufarbeitung	19
3.1.	Vorbereitung des Gewebes	19
3.2.	Herstellung von Paraffinschnitten	19
3.3.	Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE)	20
3.4.	Die Labeled (Strept-) Avidin-Biotin-Methode (LAB/LSAB-Methode)	20
3.5.	Protokoll der immunhistochemischen Färbung	22

3.6.	Gegenfärbung und Einbettung	23
3.7.	Histopathologische Beurteilung und Dokumentation	24
IV.	STATISTIK	25
V.	ERGEBNISSE	26
1.	Immunhistochemische Untersuchung mit dem Marker S-100	26
2.	Immunhistochemische Untersuchung mit dem Marker HMB-45	28
3.	Immunhistochemische Untersuchung mit dem Marker Melan-A	29
4.	Immunhistochemische Untersuchung mit dem Marker CD3	30
5.	Immunhistochemische Untersuchung mit dem Marker CD68	31
6.	Immunhistochemische Untersuchung mit dem Marker Ki67	33
7.	Ergebnisse der linearen Diskriminanzanalyse	34
VI.	DISKUSSION	35
1.	Stellenwert der immunhistochemischen Untersuchung in der heutigen Tumordiagnostik	35
2.	Immunhistochemische Differenzierung anhand melanozytärer Marker	36
2.1.	S-100	36
2.2.	HMB-45	38
2.3.	Melan-A	41
3.	Immunhistochemische Differenzierung anhand der inflammatorischen Marker CD3 und CD68	42
4.	Immunhistochemische Differenzierung anhand Ki 67 als Marker für Zellproliferation	43
5.	Lineare Diskriminanzanalyse	43
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	45
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	47
IX.	DANKSAGUNG	53

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AK	Antikörper
ARVO	Association for Research in Vision and Ophthalmology
CD	Clusters of Differentiation
c-MIN	konjunktivale melanozytäre intraepitheliale Neoplasie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
LAB/LSAB	Labeled (Strept-) Avidin-Biotin-Methode
MART	Melanocytic Antigen Recognized by T-cells
PAM	Primary Acquired Melanosis – primär erworbene Melanose
PEComa	Perivascular Epithelioid Cell Tumour

I. EINLEITUNG

1. Die Bindehaut

Die Bindehaut (Tunica conjunctiva) bedeckt als vaskularisierte Schleimhaut den inneren Anteil der Augenlider (Conjunctiva palpebrae), bildet im oberen und unteren Fornix eine Umschlagfalte (Conjunctiva fornix) und setzt sich dann über die anteriore Sklera als Conjunctiva bulbi bis zum Hornhautrand, dem sogenannten Limbus corneae, fort.

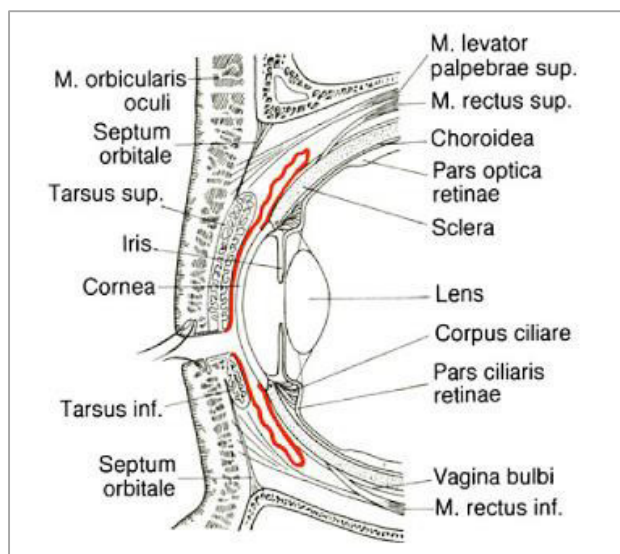


Abb. 1: Schnitt durch Augenlider und vorderen Bulbus oculi mit Tunica conjunctiva rot gezeichnet (1)

Die Conjunctiva bulbi ist leicht gegen die Sklera verschieblich, während die Conjunctiva palpebrae relativ fest mit dem Tarsus verbunden ist. In den Fornices liegen Reservefalten für die Augenbewegungen. Innerviert wird die Bindehaut von den Nervi ciliares longi, die Blutversorgung erfolgt durch die Arteriae conjunctivales anteriores (gespeist aus den Arteriae ciliares anteriores, Äste der Arteria lacrimalis) (1).

Histologisch gesehen besteht die Bindehaut aus einem mehrschichtigen, nicht verhornenden Plattenepithel mit Becherzellen, deren merokrine Sekretion von Mukopolysacchariden einen wichtigen Teil des Tränenfilms darstellt. In den basalen Epithelschichten liegen Melanozyten. Diese kommen insbesondere am Limbus, im Bereich der Fornices, der Plica semilunaris und der Karunkel vor (2).

Das von ihnen sezernierte Melanin dient dem Schutz vor ultravioletter Strahlung (3).

Das darunterliegende Stroma, auch Substantia propria genannt, besteht aus fibrovaskulärem Bindegewebe, Nerven und Lymphgefäßen. Es finden sich Ansammlungen von Monozyten, Lymphozyten, Plasmazellen und anderen entzündlichen Zellen. Lymphfollikel sind charakteristischerweise im Bereich der Fornices lokalisiert.

Im Bereich des nasalen Lidwinkels liegen die Karunkel sowie die Plica semilunaris, Rudimente der sogenannten Nickhaut, die bei einigen Tierarten zu finden ist. Die Plica semilunaris weist als Bindehautduplikatur ein dem der Conjunctiva bulbi vergleichbares Epithel auf, jedoch mit besonders zahlreichem Becherzellbesatz. Die Karunkel dagegen als Übergangszone von Bindehaut zu Haut wird wechselnd von Epidermis und nichtverhornendem Plattenepithel bedeckt. Es zeigen sich auch Lanugohaare, Talg-, Schweiß- und akzessorische Tränendrüsen (1).

2. Melanozytäre Läsionen der Bindehaut

Melanozyten sind „Zur Melaninbildung befähigte Zellen in der Basalschicht der Epidermis. ... Sekretionsprodukt ist das Melanin, ... Sie kommen auch in Teilen des Auges und in den Leptomeningen vor.“ (4).

Die Melanozyten entstammen der Neuralleiste und wandern von dort aus in ihr Zielgewebe. Im Bereich der Bindehaut treten sie sowohl intraepithelial, insbesondere in den basalen Zellschichten, als auch subepithelial in der Substantia propria auf. Gemeinsam ist ihnen die Fähigkeit der Melaninproduktion, wobei die dendritischen intraepithelialen Melanozyten Melanin an benachbarte epitheliale Zellen abgeben, während die subepithelialen Melanozyten Melanin in den extrazellulären Raum freisetzen, beispielsweise als Reaktion auf Verletzung (5).

Intraepitheliale Melanozyten sind Ursprung der meisten Bindehautnaevi (junktionale, Compound-, sowie subepitheliale Naevi), der Hautfarben-assoziierten Pigmentierung, der primär erworbenen Melanosen (Primary Acquired Melanosis - PAM) und des malignen Melanoms (6).

Im Folgenden soll ein Überblick über die in der Arbeit beobachteten melanozytären

Bindehautläsionen und ihre klinischen und histopathologischen Merkmale gegeben werden.

2.1. Bindehautnaevi

2.1.1. Klinisches Erscheinungsbild

Bindehautnaevi imponieren als relativ scharf begrenzte, flache bis mäßig erhabene Verdickungen der Bindehaut mit unterschiedlich stark ausgeprägter Pigmentierung. Sie sind vornehmlich am Limbus, an der Lidkante, der Karunkel oder der Plica semilunaris lokalisiert. Hyperpigmentierungen an anderer Stelle, insbesondere im Bereich des Fornix oder der tarsalen Bindehaut gelten als verdächtig auf das Vorliegen einer primär erworbenen Melanose oder eines Melanoms und sollten kritisch beobachtet und gegebenenfalls biopsiert werden (7).

Ein charakteristisches Merkmal von Bindehautnaevi ist das Vorkommen von Pseudozysten (in ca. 50%), die durch Epitheleinstülpung oder –verschleppung in die tieferen Schichten und Sekretion der Becherzellen in den neu entstandenen Innenraum entstehen. Diese stellen ein wichtiges klinisches Unterscheidungskriterium dar (2,6).



Abb. 2: Klinisches Bild eines Bindehautnaevus

Bindehautnaevi sind als Hamartome zu werten und stellen sich vor der Pubertät meist wenig pigmentiert oder gar für das blanke Auge unsichtbar dar. Während der Pubertät und danach steigt die Pigmentproduktion der Naevuszellen. Veränderungen der Pigmentierung können für den Patienten wie für den Augenarzt

beunruhigend wirken und eventuell auch ein Wachstum vortäuschen (2,8). Auch im Zuge einer Schwangerschaft kann die Pigmentierung variieren (6).

2.1.2. Histopathologisches Erscheinungsbild

Es können 5 verschiedene Typen konjunktivaler Naevi unterschieden werden: junktionale Naevi, Compoundnaevi, subepitheliale Naevi sowie als Sonderformen der Spindelzellnaevus und der blaue Naevus (9,2,3).

Der Spindelzellnaevus als Variante des Compoundnaevus ist eine benigne Läsion, die lediglich in der Kindheit auftritt. Der blaue Naevus ist seinem dermatologischen Pendant entsprechend tief in der Substantia propria lokalisiert und hat seinen Ursprung in Zellen aus der Neuralleiste, die an ihrem eigentlichen Zielort, dem Epithel, nicht angekommen sind (6). Beide Formen sind hinsichtlich der Fragestellung dieser Arbeit nicht relevant.

Der Ota-Naevus, auch oculodermale Melanose, erscheint zwar in der Literatur bisweilen im Zusammenhang mit konjunktivalen Naevi, ist jedoch histologisch gesehen nicht in der Bindehaut lokalisiert und diesen somit im engeren Sinne nicht zugehörig (9,3).

Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Bindehautnaevi handelt es sich um junktionale, Compound- und subepitheliale Naevi. Betrachtet man Histologie als auch das Auftreten dieser Läsionen in verschiedenen Lebensabschnitten, liegt es nahe, sie als gemeinsame Entität in verschiedenen Entwicklungsstadien zu sehen (9,6). Die jeweiligen histopathologischen Merkmale sollen im Folgenden erläutert werden.

2.1.2.1. Junktionaler Bindehautnaevus

Der junktionale Bindehautnaevus besteht aus einer Anhäufung epithelialer Naevuszellen intraepithelial sowie in der Übergangszone zwischen Bindehautepithel und dem subepithelialen Bereich der Substantia propria – der „junktionalen“ Zone, der er seinen Namen verdankt. Per definitionem beschränkt sich diese Läsion auf das Bindehautepithel, die Basalmembran ist intakt. Jedoch

können vereinzelt Naevuszellnester in die Substantia propria hervorragen. Gelegentlich ist auch mitotische Aktivität zu beobachten (6).

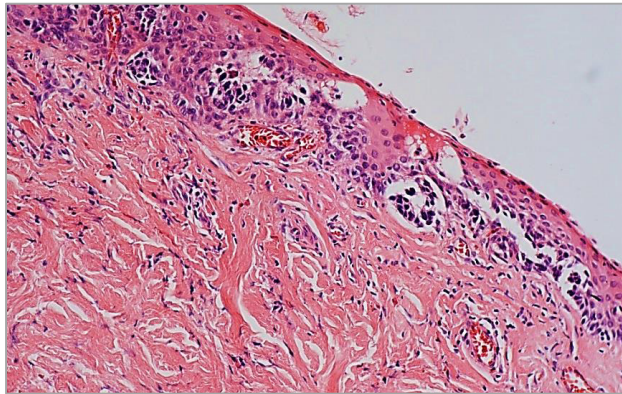


Abb. 3: Histologisches Bild eines junctionalen Bindehautnaevus (HE)

Junktionale Naevi können histologisch einer primär erworbenen Melanose mit junctionaler Aktivität oder einem beginnenden malignen Melanom sehr ähnlich sein. In solchen Fällen ist das Patientenalter ein wichtiges Unterscheidungskriterium, denn sie treten ausschließlich im Kindesalter oder bei jungen Erwachsenen auf (2,6). Der junctionale Naevus kann als Anfangsstadium in der Entwicklung eines konjunktivalen Naevus gesehen werden (9,6).

2.1.2.2. Compoundnaevus der Bindehaut

Der Compoundnaevus der Bindehaut zeichnet sich durch eine Anhäufung von Naevuszellen sowohl im Epithel als auch in der Substantia propria aus. Die epithelialen Naevuszellen wandern in den subepithelialen Raum. Kommt es zu einem regelrechten „Abtropfen“ der Naevuszellen in die Substantia propria, spricht man von junctionaler Aktivität. Diese ist per se jedoch nicht als Malignitätskriterium zu werten. Histologisch kann im Zuge der Wanderung eine gewisse „Reifung“ der Naevuszellen beobachtet werden. Die epithelialen und subepithelialen Naevuszellen stellen sich größer und ovalärer dar als die tiefer gelegenen Zellen (2).

Durch Einstülpung des Epithels in die Tiefe oder Verschleppung von Epithel- und Becherzellen in die Substantia propria während des Wachstums des Naevus kann es zu den typischen Pseudozysten kommen. Auch, wenn Pseudozysten charakteristisch für Bindehautnaevi sind und erfahrungsgemäß in primär erworbenen Melanosen nicht vorkommen, schließt das Vorliegen von Pseudozysten ein malignes Geschehen nicht aus. Da maligne Melanome aus Bindehautnaevi entstehen können ist auch ein Nebeneinander von Pseudozysten und Melanom möglich (6).

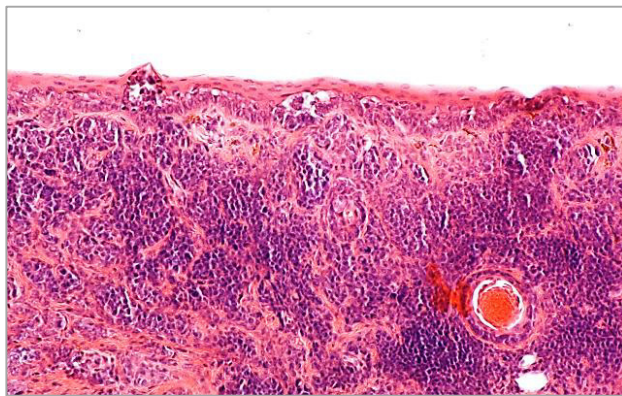


Abb. 4: Histologisches Bild eines Compoundnaevus der Bindehaut (HE)

2.1.2.3. Subepithelialer Bindehautnaevus

Entsprechend dem Bild einer stadienhaften Entwicklung und Differenzierung von Bindehautnaevi wandern die Naevuszellen im Laufe des Lebens tiefer in die Substantia propria, bis keine epithelialen Anteile mehr erkennbar sind. Es kommt zu einem subepithelialen Naevus (2).

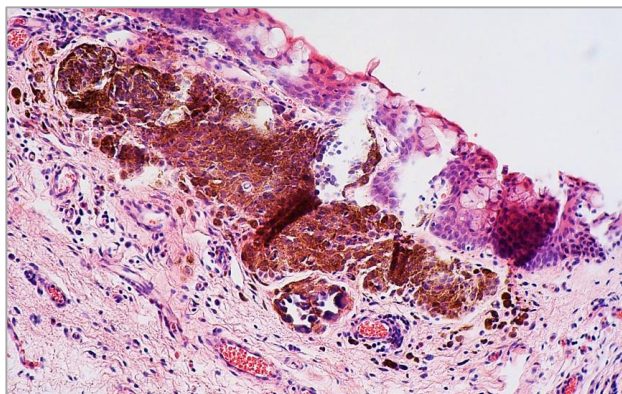


Abb. 5: Histologisches Bild eines subepithelialen Bindehautnaevus (HE)

2.2. Primär erworbene Melanose

Trotz oder vielleicht gerade infolge der Vielzahl an Publikationen zu dem Thema bleibt die Klassifikation und Terminologie der melanozytären Bindehautläsionen kontrovers und uneinheitlich, was insbesondere hinsichtlich der Melanosen zu Verwirrung in der Kommunikation zwischen Pathologen und Klinikern als auch unter Experten gleicher Fachrichtung führen kann (3,10,11).

Kern der Problematik ist die Zusammenfassung histologisch heterogener Veränderungen (konjunktivale Hyperpigmentation, melanozytäre Proliferation) unter dem klinischen Begriff der Melanose sowie die Frage, wie dem neoplastischen Charakter mancher intraepithelialer Läsionen auch in der Nomenklatur Ausdruck verliehen werden kann (3).

Im Folgenden werden die wohl am gebräuchlichsten und von der World Health Organisation unterstützen Begriffe der primär erworbenen Melanose ohne bzw. mit Atypie verwendet, da auch das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Material nach dieser Methode befundet wurde.

Dabei steht bei diesem von Klinikern und Pathologen gleichermaßen verwendeten Begriff primär für die Tatsache, dass die Läsion nicht im Rahmen einer generell dunklen Pigmentation, einer systemischen Erkrankung (wie z.B. dem M. Addison) oder lokaler Faktoren (Entzündung, Fremdkörper) zu sehen ist. Mit der Bezeichnung als erworben soll die Läsion von angeborenen Veränderungen abgegrenzt werden. Zuletzt steht die Melanose für eine durch Produktion von Melanin und nicht etwa anderer Pigmente oder Ablagerungen bedingte Läsion (10). Als Sonderfall ist die sogenannte PAM sine pigmento zu erwähnen, bei der klinisch kein Pigment zu erkennen ist.

2.2.1. Klinisches Erscheinungsbild

Die primär erworbene Melanose zeigt sich klinisch als eine meist unilaterale, flache, unscharf begrenzte und unregelmäßige Hyperpigmentierung der Bindehaut (10,2,3). Diese kann an sämtlichen Stellen der Bindehaut auftreten, weswegen eine Inspektion des Fornix und der tarsalen Bindehaut mittels Ektropionieren bei der klinischen Untersuchung unerlässlich ist. Betroffen sind vorwiegend Patienten mittleren oder fortgeschrittenen Alters.

Veränderungen im Sinne eines Zu- oder Abnehmens an Pigment, Veränderungen der Größe und Ausbreitung werden als „waxing and waning“ bezeichnet und sind Folge variabler Melaninproduktion und Melanozytenproliferation (10).

Klinisch ist eine Unterscheidung zwischen PAM ohne und mit Atypie nicht möglich.

Eine Zunahme der Pigmentierung, Veränderungen der Vaskularisation, umschriebene Verdickungen, noduläre Veränderungen sowie die Entwicklung einer umgebenden Entzündungsreaktion können Zeichen einer malignen Veränderung sein und bedürfen gegebenenfalls der diagnostischen Exzision (2,12,13).



Abb. 6: Klinisches Bild einer primär erworbenen Melanose der Bindehaut

2.2.2. Histopathologisches Erscheinungsbild

2.2.2.1. PAM ohne Atypie

Die PAM ohne Atypie zeichnet sich durch eine intraepitheliale Proliferation von Melanozyten aus. Es findet sich eine erhöhte Anzahl von Melanozyten in den basalen Zellschichten des Epithels ohne zelluläre Atypie. Diese Melanozyten können normal oder hypertroph erscheinen, teilweise zeigen sie auch vermehrt Dendriten (14,15,10).

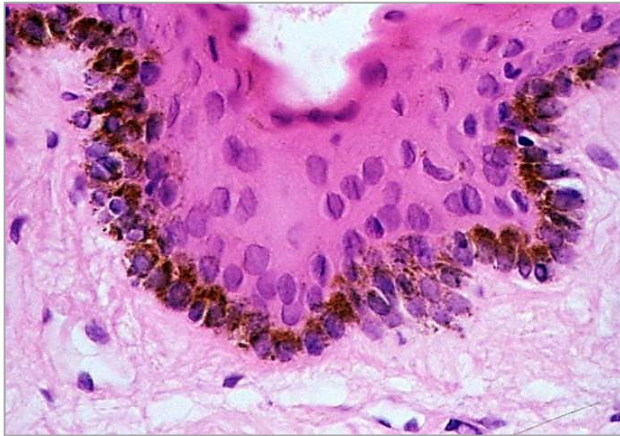


Abb. 7: Histologisches Bild einer primär erworbenen Melanose der Bindehaut ohne Atypie (HE)

2.2.2.2. PAM mit Atypie

Die melanozytäre Proliferation der PAM mit Atypie weist zelluläre Polymorphie und Atypie auf. Die Basalmembran ist intakt, es zeigt sich keine Invasion der Substantia propria (14,15,10). Es können verschiedene Typen von atypischen Melanozyten beobachtet werden: Proliferation kleiner polyedraaler Zellen, Spindelzellen, große Melanozyten mit ausgeprägten Dendriten, runde Epitheloidzellen oder gegebenenfalls verschiedene der genannten Typen nebeneinander in unterschiedlichen Anteilen der Läsion (10). Außerdem präsentieren die proliferierenden Melanozyten variable Verteilungsmuster. Sie können sich entlang der basalen Schichten des Epithels anordnen, basale Nester bilden, als intraepitheliale Nester die höheren Schichten des Epithels einnehmen, sich einzeln vertikal im Bindehautepithel ausbreiten (sogenannte „pagetoide“ Ausbreitung) oder gar die Gesamtheit des Epithels invadieren (10). Begleitend können eine mononukleäre Entzündungsreaktion, Melanophagen und eine Lymphangiektasie in der darunterliegenden Substantia propria beobachtet werden (10). Anhand dieser Kriterien wird die Atypie als mild, mäßiggradig oder schwer eingestuft. Ein Carcinoma in situ-Status der PAM mit schwerer Atypie wurde in der TNM-Klassifikation von 2009 neu eingeführt (16). Darunter fallen PAM mit Atypie, die > 75% des Epithels einnehmen und eine epitheloide Zytologie, vesikuläre Nuclei oder prominente Nucleoli und/oder intraepitheliale Nester atypischer Zellen aufweisen. Ein Fortschritt, der der anhaltenden Diskussion über die Heterogenität der Gruppe der PAM mit Atypie, insbesondere hinsichtlich ihres

biologischen Verhaltens und des Risikos der Progression zu einem invasiven malignen Melanom der Bindehaut Rechnung trägt.

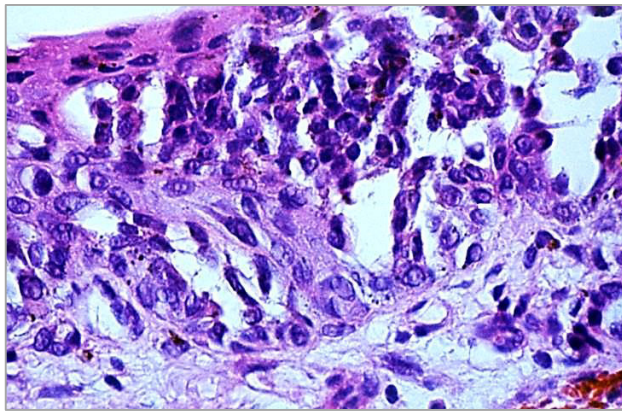


Abb. 8: Histologisches Bild einer primär erworbenen Melanose der Bindehaut mit Atypie (HE)

2.2.2.3. Histopathologische Merkmale mit hohem Risiko der Progression zum invasiven malignen Melanom

Gemäß der WHO-Klassifikation melanozytärer Bindehautläsionen (17) wird bei den PAM mit Atypie zwischen milder, mäßiggradiger und schwerer Atypie unterschieden. Eine standardisierte, allgemein gültige Definition der angegebenen Subgruppen existiert nicht, so dass hier die Erfahrung und Interpretation des Befundes von Seiten des Untersuchers eine entscheidende Rolle spielt. Die Zusammenfassung dieser heterogenen Befunde unter dem Begriff der PAM mit Atypie führte zu dem Versuch, histopathologische Merkmale zu identifizieren, die eine Einschätzung des jeweiligen Risikos zur Progression der Läsion in ein invasives malignes Melanom erlauben.

Sugiura et al. (18) untersuchten 29 Fälle von PAM mit Atypie hinsichtlich ihres histopathologischen Erscheinungsbildes sowie der Häufigkeit der Assoziation eines invasiven Bindehautmelanoms mit oder ohne Metastasierung. Anhand ihrer Ergebnisse identifizierten die Autoren eine Hochrisikogruppe, gekennzeichnet durch verschiedene Grade epitheloidzelliger Morphologie mit mäßiger bis niedriger Kern/Plasma-Rate, großen Zellkernen, teils mit sichtbaren Nucleoli und vesikulärem Muster. Das Verteilungsmuster der atypischen Zellen in dieser Gruppe stellte sich heterogen dar, mit jedoch vorwiegend pagetoider Ausbreitung einzelner

Zellen im Bindehautepithel. Diese Hochrisikogruppe war in 15 von 16 Fällen (94%) mit einer Invasion der Lamina propria, also mit einem malignen Melanom assoziiert, in 25% der Fälle mit Metastasen. Im Vergleich dazu zeigte die Niedrigrisikogruppe (kleine bis mittelgroße Zellen mit hoher Kern/Plasma-Rate, kleine hyperchromatische Zellkerne, basales Verteilungsmuster) nur in 15% der Fälle eine Invasion der Lamina propria und keine Metastasen. Fälle mit gemischter Morphologie verhielten sich wie jene der Hochrisikogruppe, woraus die Gruppe eine mögliche Progression einer Niedrigrisiko-Läsion über die Stufe der Hochrisiko-Läsion zum invasiven malignen Melanom schloss.

Bereits Folberg et al. beschrieben einen Zusammenhang zwischen epitheloider Zellmorphologie und Progressionsrisiko. In 75% der Fälle mit Epitheloidzellen beobachteten sie eine Progression zum Malignen Melanom – bei vertikaler Invasion des Bindehautepithels erhöhte sich die Zahl auf 90%. Dagegen stehen 25% Progression bei nicht-epitheloider Zellmorphologie und 22% bei basalem Verteilungsmuster (19,14).

In den Beobachtungen von Shields et al. (20) lagen die Progressionszahlen deutlich niedriger. Hier wurden PAM ohne Atypie, PAM mit milder Atypie und PAM mit schwerer Atypie verglichen. Dabei wurden die Läsionen mittels ähnlicher histologischer Merkmale eingeteilt: PAM ohne Atypie zeigten lediglich eine Hyperpigmentation des basalen Bindehautepithels mit oder ohne benigner melanozytärer Hyperplasie, PAM mit milder Atypie wiesen atypische Melanozyten im Bereich der basalen Epithelschicht auf, wohingegen PAM mit schwerer Atypie als atypische melanozytäre Hyperplasie mit vertikaler Invasion und/oder Epitheloidzellen definiert wurden. Eine Progression zum invasiven Bindehautmelanom zeigte sich in 0% der PAM ohne Atypie, in ebenfalls 0% der PAM mit milder Atypie sowie in 13% der PAM mit schwerer Atypie.

Damato und Coupland (3) schlagen eine standardisierte Dokumentation verschiedener histopathologischer Merkmale anhand eines Beurteilungsbogens vor. Auch hier werden Verteilungsmuster der atypischen Melanozyten, vertikale Invasion und zellmorphologische Merkmale wie Kerngröße, Zytoplasmamenge und Nucleoli sowie sichtbare Mitosen als Grundlage zur Beurteilung herangezogen. Zusätzlich schlägt die Gruppe mit dem System der c-MIN (conjunctival melanocytic intraepithelial neoplasia) eine alternative Klassifikation und

Nomenklatur vor, um dem neoplastischen Charakter dieser intraepithelialen Läsionen gerecht zu werden. Da diese Einteilung nach Beginn unserer Studie publiziert wurde, kam sie in dieser Arbeit nicht zur Anwendung.

2.3. Das maligne Melanom der Bindehaut

Das maligne Melanom der Bindehaut ist mit einem Anteil von 2% der okulären Melanome und einer Inzidenz von 0,02 bis 0,08 pro 100 000 Einwohnern pro Jahr in einer kaukasischen Bevölkerung (21) eine seltene, jedoch potentiell tödliche Erkrankung. Die 5-Jahres-Mortalität liegt bei 19%, nach 10 Jahren bei 30%. Betroffen sind vornehmlich hellhäutige Personen mittleren bis höheren Alters unabhängig ihres Geschlechts. Fälle von Bindehautmelanomen in den ersten zwei Lebensdekaden oder bei Patienten mit dunkler Hautfarbe sind rar (12,21,22).

Dabei wird davon ausgegangen, dass ca. 75 % der malignen Melanome aus einer PAM mit Atypie hervorgehen, in ca. 20 % der Fälle kann die Präsenz eines Bindehautnaevus beobachtet werden. Bei 12% der Bindehautmelanome wird eine Genese de novo, also ohne erkennbare Precursor-Läsion, vermutet, wobei die Möglichkeit besteht, dass in einigen Fällen lediglich die vorangegangene Läsion als solche nicht mehr zu erkennen ist (14,21,23,24).

Neben einer möglichen direkten Infiltration von Augapfel oder Orbita, sind im Falle der Metastasierung regional insbesondere die präaurikulären und submandibulären Lymphknoten betroffen. Eine systemische Metastasierung findet meist in die Lunge, Gehirn, Leber, Haut, Knochen und Gastrointestinaltrakt statt (11,25,26). Als prognostisch ungünstige Faktoren gelten die Lokalisation im Bereich des Fornix, der tarsalen Bindehaut, Karunkel oder Plica semilunaris sowie die Tumordicke (je nach Literatur schwankend: > 0,8mm bis > 1,8mm - die Beteiligung der Cornea erhöht das Rezidivrisiko (21,24,26,27,28).

In der aktuellen TNM-Klassifikation wurden neben den klassischen Kriterien auch prognostische Faktoren, wie beispielsweise Lokalisation, Tumordicke oder ZNS-Beteiligung bei der Einteilung berücksichtigt (16). Die WHO-Klassifikation melanozytärer Bindehautläsionen teilt das Invasive Melanom nach der Genese aus PAM mit Atypie, aus einem Naevus sowie de novo ein (17).

2.3.1. Klinisches Erscheinungsbild

Das klinische Erscheinungsbild des malignen Melanoms der Bindehaut ist ausgesprochen variabel (29,30,31). Ob pigmentierte oder fleischfarbene Prozesse, flach oder nodulär und an jedweder Lokalisation – dieser Tumor hat viele Gesichter.

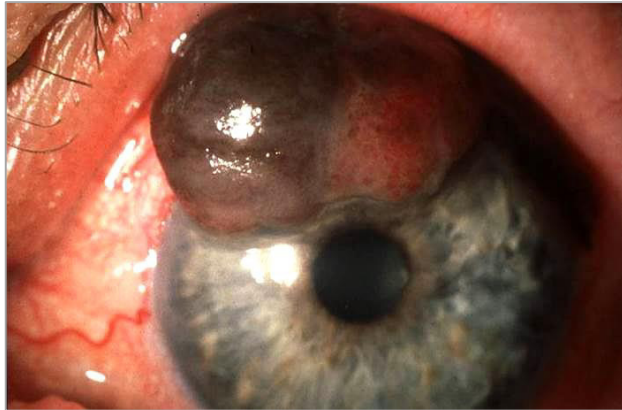


Abb. 9: Klinisches Bild eines malignen Melanoms der Bindehaut

Oftmals liegt auch ein „Nebeneinander“ verschiedener melanozytärer Läsionen mit teils fließenden Übergängen vor, was die Diagnose zusätzlich erschwert. Eine Größenzunahme, verstärkte Pigmentierung, Verdickung, Änderungen der Vaskularisation oder die Entwicklung einer umgebenden Entzündungsreaktion können Hinweise auf ein malignes Geschehen sein. Darüber hinaus ist jede melanozytäre Veränderung im Bereich der Conjunctiva palpebrae dringend malignitätsverdächtig (10,21).

Umso wichtiger ist die ausführliche Inspektion, insbesondere auch der tarsalen Bindehaut und der Fornices, sowie die detaillierte Dokumentation, um auch frühe Veränderungen als solche zu erkennen und bei Malignitätsverdacht einer, wenn möglich, exzisionalen Biopsie zuzuführen.

2.3.2. Histopathologisches Erscheinungsbild

Das invasive maligne Melanom zeichnet sich durch eine Invasion atypischer Melanozyten in die Substantia propria der Bindehaut aus (6,10). Dabei werden 4 verschiedene Zelltypologien unterschieden, die unabhängig voneinander oder in Mischformen auftreten können: polyedrische Zellen, Epitheloidzellen, Ballonzellen und Spindelzellen (10,24). Die letzteren drei können anhand zytologischer Kriterien

wie Kern/Plasma-Relation, Vorhandensein prominenter Nucleoli oder Mitosefiguren, meist eindeutig als atypisch charakterisiert werden. Formen mit kleinen polyedrischen Zellen sind manchmal nur schwer von einem jugendlichen Naevus zu unterscheiden.

Die Durchführung einer Depigmentierung zur besseren Darstellung der zytologischen Merkmale kann hier hilfreich sein. Einen weiteren Anhalt bietet die Anordnung der atypischen Zellen. Diese zeigen sich ähnlich wie bei der PAM mit Atypie in der junctionalen Zone, können dort Nester bilden und sich einzeln oder in Gruppen pagetoid in die oberen Epithelschichten ausbreiten.

Eine sich über die lateralen Grenzen der invasiven Läsion ausbreitende intraepitheliale Komponente kann ebenfalls auf ein malignes Geschehen hinweisen. Eine begleitende Entzündungsreaktion und eine fehlende Differenzierung der Zellen an der Basis der subepithelialen Komponente in der Substantia propria können Zeichen für das Vorliegen eines Malignen Melanoms sein (10).

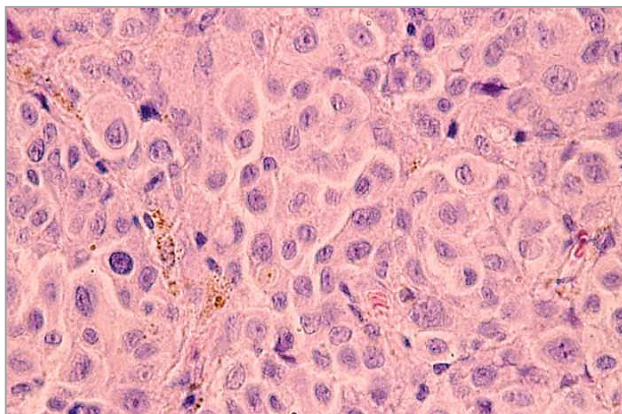


Abb. 10: Histologisches Bild eines malignen Melanoms der Bindehaut (HE)

In der WHO-Klassifikation melanozytärer Bindehautläsionen ist ein Melanoma in situ Status der PAM mit schwerer Atypie nicht vorgesehen (17).

Dahingegen wird in der aktuellen TNM-Klassifikation eine PAM mit schweren Atypien, die über 75% des Epitheliums einnimmt, eine epitheloide Zytologie, vesikuläre Nuclei oder prominente Nucleoli aufweist und/oder intraepitheliale Nester atypischer Zellen bildet, als Melanoma in situ eingestuft (16).

2.3.3. Borderline-Läsionen

Nichtsdestotrotz gibt es Läsionen, die anhand der gängigen Kriterien nicht eindeutig und reproduzierbar zugeordnet werden können (32,33). Diese, als „indeterminate melanocytic proliferations“ oder auch „Borderline“-Läsionen bezeichneten Fälle, zeigen sowohl Kennzeichen benigner als auch maligner Veränderungen. Dies bedingt, dass beispielsweise ein junctionaler Naevus histologisch teils nicht eindeutig von einer PAM mit Atypien oder von einem malignen Melanom zu unterscheiden ist.

In einer Studie der Gruppe um Grossniklaus wurden gezielt solche Grenzläsionen hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der histopathologischen Diagnose durch erfahrene Ophthalmopathologen untersucht (32). Diese wiesen Merkmale wie junctionale Aktivität, Anhäufungen pleomorpher Zellen im Bereich der Substantia propria, Maturationsverlust von der Oberfläche zur Basis der Läsion sowie teils nahezu vollständige intraepitheliale Ausbreitung auf. Im Gegensatz zu den untersuchten, eindeutig benignen oder eindeutig malignen Gruppen, zeigte sich dabei in der Gruppe der Grenzläsionen eine derartige Uneinigkeit zwischen den einzelnen Untersuchern, dass selbst bei einer zufälligen Einteilung statistisch mehr Übereinstimmung zu erwarten gewesen wäre. Auch die nochmalige Beurteilung in Kenntnis klinischer Angaben wie Alter, Geschlecht, Uni- oder Bilateralität erhöhte die Konkordanz zwischen den Untersuchern nicht.

In Hinblick auf die großen Unterschiede im biologischen Verhalten und die im Falle einer falschen Einschätzung schlimmstenfalls letalen Konsequenzen, besteht gerade in diesen Grenzfällen ein Bedarf nach einer über die rein histologisch-zytologischen Maßstäbe hinausgehenden Methode, um benigne von potentiell malignen und malignen Läsionen zu unterscheiden.

Die vorliegende Arbeit greift an genau diesem Punkt an, um mit Hilfe immunhistochemischer Untersuchungen eine Diagnosefindung zu erleichtern und somit Therapie und Prognose dieser Patienten zu optimieren.

II. ZIELE DER ARBEIT

Wie bereits ausgeführt, kann die Differenzierung melanozytärer Bindehautläsionen sowohl für den Kliniker als auch für den Histopathologen eine Herausforderung darstellen. Eine sichere Unterscheidung zwischen benignen, potentiell malignen und malignen Bindehauttumoren ist essentiell für das weitere Patientenmanagement. Es gilt, potentiell maligne und maligne Formen frühzeitig zu erkennen, um eine gezielte Therapie einzuleiten. Im Falle benigner Bindehauttumore sollen unnötige, für den Patienten belastende und nicht zuletzt kostenintensive diagnostische und therapeutische Maßnahmen möglichst vermieden werden.

In Anbetracht des häufig sehr variablen klinischen Erscheinungsbildes kommt der histopathologischen Analyse dieser Läsionen zur Diagnosesicherung eine große Bedeutung zu. Eine Beurteilung anhand rein zytologischer Merkmale gestaltet sich jedoch in einigen Fällen, insbesondere in den klinisch relevanten Grenzbereichen zwischen benignen, potentiell malignen und malignen Läsionen, als schwierig.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, folgende Fragen zu beantworten:

- Bestehen charakteristische Unterschiede im Färbeverhalten für immunhistochemische melanozytäre und entzündliche Marker zwischen benignen, potentiell malignen und malignen melanozytären Bindehauttumoren?
- Ist eine eindeutige Differenzierung dieser Läsionen anhand einzelner immunhistochemischer Marker möglich?
- Führt die Kombination verschiedener immunhistochemischer Marker zu einem weiteren Informationsgewinn?

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Patientengut

Die für die Untersuchungen verwendeten Gewebeproben wurden zwischen 2002 und 2008 im Rahmen von diagnostischen und therapeutischen Bindehautexzisionen bei Patienten mit melanozytären Bindehauttumoren an der Augenklinik der LMU München gewonnen.

Alle Pathologien konnten eindeutig in die Gruppen Naevus, PAM ohne/mit Atypien oder malignes Melanom zugeordnet werden. Sämtliche Patienten willigten in die Entnahme sowie histologische und immunhistochemische Untersuchung des Gewebes schriftlich ein.

Es wurde Material von 53 Patienten mit Bindehautnaevi untersucht, darunter 27 Frauen und 26 Männer im Alter von 7-74 Jahren. Das mittlere Alter in der Gruppe der Bindehautnaevi lag bei 29,3 Jahren (\pm 18,5 Jahre). Weiterhin wurde Gewebe von 9 Patienten mit der Diagnose einer PAM ohne Atypien analysiert, darunter 4 Frauen und 5 Männer im Alter von 24 bis 67 Jahren, mittleres Alter 43,7 Jahre (\pm 14,1 Jahre).

Die Gruppe der 25 Patienten mit einer PAM mit Atypien setzte sich aus 16 Frauen und 9 Männern im Alter von 23 bis 79 Jahren mit einem mittleren Alter von 57,0 Jahren (\pm 15,4 Jahre) zusammen. Das Exzisionsmaterial der 24 malignen Bindehautmelanome stammte von 19 Frauen und 5 Männern im Alter von 35 bis 90 Jahren mit einem mittleren Alter von 63,8 Jahren (\pm 12,1 Jahre).

2. Antikörper

Die im Rahmen der Studie durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen wurden mit folgenden Primärantikörpern durchgeführt:

Tabelle 1: Aufstellung der in der Arbeit verwendeten immunhistochemischen Antikörper

Antikörper	Firma	Host	Clon	Best.-Nr.	Aufbewahrung	Vorbehandlung	Primärantikörper
CD3	Dako	mouse	F 7.2.38	M 7254	Kühlschrank + 4°C	ph 9/ 20 Min Dampfgarer	1:100 // 1/2 Std.
CD68	Dako	mouse	PG-M 1	M 0876	Kühlschrank + 4°C	ph 9/ 20 Min Dampfgarer	1:100 // 1/2 Std.
HMB-45	Dako	mouse	HMB 45	M 0634	Kühlschrank + 4°C	ohne Vorbehandlung	1:50 // 1/2 Std.
Ki67	Dako	mouse	MIB-1	M 7240	Kühlschrank + 4°C	ph 9/ 20 Min Dampfgarer	1:100 // 1/2 Std.
Melan-A	Dako	mouse	A-103	M 7196	Kühlschrank + 4°C	ph 9/ 20 Min Dampfgarer	1:100 // 1/2 Std.
S-100	Dako	rabbit	poly	Z 311	Kühlschrank + 4°C	ohne Vorbehandlung	1:10.000 // 1/2 Std.

Als Sekundärantikörper kamen Kaninchen-Anti-Maus-AK (Firma DakoCytomation, Hamburg) und je nach Primärantikörpertyp zusätzlich Maus-Anti-Kaninchen-AK (Firma DakoCytomation, Hamburg) zum Einsatz.

S-100, HMB-45 sowie Melan-A sind etablierte Antikörper zur Darstellung melanozytärer Prozesse (34,35). S-100 ist ein Kalzium bindendes Protein, das als Screeningmarker für maligne Melanome eingesetzt wird und das eine sowohl nucleäre als auch cytoplasmatische Färbung aufweist (34,35). Für maligne Melanome der Bindehaut wird eine Sensitivität von 87- 100% angegeben (36,37,38,39). Da es auch in vielen anderen Geweben, wie zum Beispiel Nervenscheiden, Chondrozyten, Langerhanszellen und den von Ihnen ausgehenden Tumoren, exprimiert wird, wird die Kombination mit einem spezifischeren melanozytären Marker empfohlen (34,35).

HMB-45 markiert das Glycoprotein gp100 zytoplasmatischer Prämelanosomen aktivierter und neoplastischer Melanozyten (34,35,40). Das dem Marker zugrundeliegende Immunogen entstammt einer axillären Lymphknotenmetastase eines pigmentierten Melanoms mit dem Ziel, einen spezifischen Marker für diese Läsionen zu schaffen (41). HMB-45 reagiert positiv mit kutanen malignen Melanomzellen, mit junctionalen Naevuszellen, Spitznaevi und atypischen melanozytären Hyperplasien der Haut sowie fetalen und neonatalen Melanozyten. Epidermale Naevi der Haut und normale Melanozyten des Erwachsenen färben negativ mit diesem Marker (41). Die Sensitivität von HMB-45 bei malignen Melanomen der Bindehaut liegt zwischen 72-96% (36,37,38,39,42), die Spezifität

im Bereich von 51,5% (38).

Melan-A ist ein cytoplasmatisches Protein melanozytärer Differenzierung (43). Es sind 2 Klone dieses Antikörpers unter den Namen MART-1 (Melanoma antigen recognized by T-cells) beziehungsweise Melan-A erhältlich, die vergleichbare Färbeeigenschaften aufweisen (44). Hinsichtlich des malignen Melanoms der Bindehaut wird eine Sensitivität von bis zu 100% beschrieben (36). Im Gegensatz zu MART-1 färbt Melan-A auch adrenocorticale Neoplasmen und gonadale steroidale Tumore, beide Klone reagieren außerdem positiv mit der Familie der PEComa - perivaskulären epithelioidzelligen Tumoren wie beispielsweise Angiomyolipomen und klarzelligen Sarkomen (45).

CD steht für Clusters of Differentiation, anhand dieser Oberflächenantigene können Leukozyten nach Funktion und Reifungszustand klassifiziert werden (46). Die Leukozytenantigene werden mittels monoklonaler Antikörper immunhistochemisch dargestellt. Sowohl in benignen als auch malignen melanozytären Läsionen der Bindehaut kann eine entzündliche Begeitreaktion durch CD3 positive T-Zellen sowie CD68 positiven Makrophagen beobachtet werden (47,48).

Ki67 ist ein nucleäres Antigen, das in allen aktiven Phasen des proliferativen Zellzyklus (F1, S, G2 und M) vorhanden ist, jedoch in der ruhenden Phase nicht exprimiert wird (49). Der immunhistochemische Marker wird dementsprechend als Proliferationsmarker in der Beurteilung maligner Prozesse eingesetzt.

3. Histologische Aufarbeitung

3.1. Vorbereitung des Gewebes

Die operativ gewonnenen nativen Bindehautexzidate wurden in Formalin 10 % gelagert, anschließend makroskopisch beurteilt und zugeschnitten.

3.2. Herstellung von Paraffinschnitten

Die Gewebeproben wurden zunächst in einer aufsteigenden Ethanolreihe

(hauseigene Apotheke) dehydriert, mit Xylol (Honeywell B 2410) behandelt und anschließend in Paraffin (Paraplast plus, Firma MC Cormick) eingebettet. Nach Kühlung des Paraffinblockes bei 4°C wurden mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms (HN 40 Schlittenmikrotom, Firma Pfm, Köln) histologische Schnitte mit einer Dicke von 1,5 - 2 µm angefertigt. Nach Strecken der Schnitte im Wasserbad wurden diese auf Objektträger (Superfrost Plus Thermo Scientific Objektträger, Firma Menzel Gläser, Deutschland) aufgezogen und im Brutschrank 30 Minuten bei 60°C sowie 30 Minuten bei 34°C getrocknet.

3.3. Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE)

Die angefertigten Paraffinschnitte wurden mit Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert. Nach Spülung mit destilliertem Wasser erfolgte die Inkubation mit saurer Hämaunlösung (nach P.Mayer in Romeis § 648). Anschließend wurden die Schnitte mit 0,75 % HCL in 70% Ethanol (Hausapotheke) gespült, um überschüssiges Hämaun zu entfernen und unter fließend Wasser gebläut. Im nächsten Arbeitsschritt folgte die Inkubation mit Eosinlösung 2% (filtriert, hauseigene Apotheke). Nach kurzer Spülung mit Leitungswasser wurden die nun gefärbten Schnitte mit einer aufsteigenden Ethanolreihe erneut dehydriert, mit Xylol behandelt und schließlich in Malinol (Firma Waldeck, Deutschland) eingedeckt.

3.4. Die Labeled (Strept-) Avidin-Biotin-Methode (LAB/LSAB-Methode)

Immunhistochemische Verfahren wie die Labeled (Strept-) Avidin-Biotin-Methode (LAB/LSAB-Methode) ermöglichen durch den Nachweis von Makromolekülen eine neue Dimension der histopathologischen Beurteilung. So wird über die reine Morphologie hinaus eine Art biochemische Anatomie dargestellt. Dabei handelt es sich bei der LAB/LSAB-Methode um ein indirektes Nachweisverfahren. Um das gewünschte Makromolekül, meistens handelt es sich hierbei um Proteine, darzustellen, bedient man sich bei der LAB/LSAB-Methode einer Antigen-Antikörper-Reaktion, die anschließend durch die enzymatische Freisetzung eines

Farbstoffes sichtbar gemacht wird.

Das nachzuweisende Molekül dient dabei als Antigen, das von einem spezifischen monoklonalen (Maus-) oder polyklonalen (Kaninchen-) Antikörper, dem sogenannten Primärantikörper, gebunden wird (in dieser Arbeit angewandte Antikörper sind der Tabelle 1 zu entnehmen). Im nächsten Schritt wird ein Sekundärantikörper einer anderen Spezies eingesetzt, der spezifisch an den Primärantikörper bindet. Dieser Sekundärantikörper ist mit dem wasserlöslichen Vitamin Biotin markiert (biotinyliert). Abhängig vom jeweiligen Primärantikörpertyp wurden in dieser Arbeit Kaninchen-Anti-Maus-AK (DakoCytomation, Hamburg) beziehungsweise Maus-Anti-Kaninchen-AK (DakoCytomation, Hamburg) als Sekundärantikörper eingesetzt.

Anschließend wird (Strept-) Avidin hinzugegeben, das direkt mit dem Enzym alkalische Phosphatase konjugiert ist. Hier wird sich der natürlichen Affinität von Avidin, eines wasserlöslichen, von Streptomyces Avidinii produzierten Proteins, zu Biotin bedient. Avidin bindet im Folgenden mit einer seiner vier Bindungsstellen an den biotinylierten Sekundärantikörper, welcher somit als Brücke zwischen dem primären Antigen-Antikörper-Komplex und dem Enzymkomplex fungiert (sogenannter „Brückenantikörper“).

Die Reaktion der alkalischen Phosphatase mit dem beigefügten Substratpuffer (Detektion Kit Alkalische Phosphatase LSAB rabbit/mouse, DakoCytomation, Hamburg) führt letztendlich zu einem Farbniederschlag, der das gesuchte Molekül im histologischen Schnitt sichtbar macht.

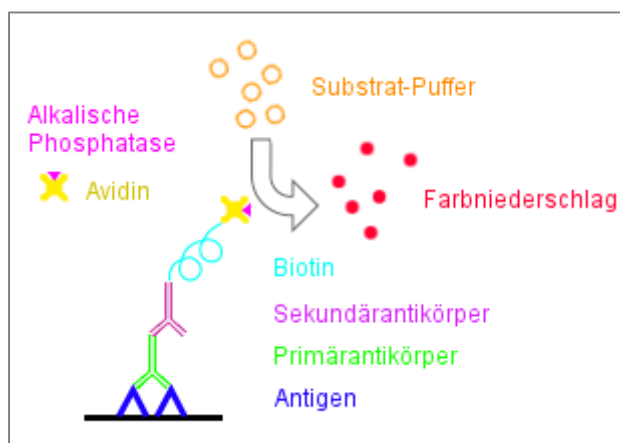


Abb. 11: Schematische Darstellung der Labeled (Strept-) Avidin-Biotin-Methode

3.5. Protokoll der immunhistochemischen Färbung

Die einzelnen Schritte der in dieser Arbeit angewandten immunhistochemischen Färbung können anhand des folgenden Protokolls nachvollzogen werden. Es wurde mit dem Detektion Kit Alkalische Phosphatase LSAB rabbit/mouse der Firma DakoCytomation (Hamburg) gearbeitet.

- **Auftragen** der circa 4 µm dicken Schnitte auf mit L-Polylysin beschichtete Objektträger (Super Frost plus Thermo Scientific, Firma Menzel Gläser)
- **Entparaaffinieren** mit Xylol (Honeywell B 2410) *2 x 10 Minuten*
- **Hydrieren** mit absteigender Ethanolreihe (vergällt) aus hauseigener Apotheke
 - Ethanol 100% *2 x 5 Minuten*
 - Ethanol 96% *2 x 5 Minuten*
 - Ethanol 70% *2 - 3 x Spülen*
- **Spülen** in destilliertem Wasser, bis sämtliche Alkoholschlieren entfernt sind
- **Hitzeinduzierte Vorbehandlung** für Antikörper Melan-A, CD3, CD68, Ki67
 - Kochen der Schnitte im Dampfgarer mit EDTA pH 9,0 *20 Minuten*
 - Abkühlen *15 Minuten*
 - Kurze Spülung in destilliertem Wasser
 - Waschpuffer *5 Minuten*
(Tween 20 Detergent, Calbiochem)
- Antikörper S-100 und HMB-45 bedürfen keiner Vorbehandlung
- **Ansetzen der Antikörperverdünnungen** nach Herstellerangaben
- Weiterbehandlung in der feuchten Kammer, um Austrocknung zu verhindern
- **Auftragen des Primärantikörpers**
 - Inkubation *30 Minuten*
 - Entfernung mit Waschpuffer *2 x 5 Minuten*

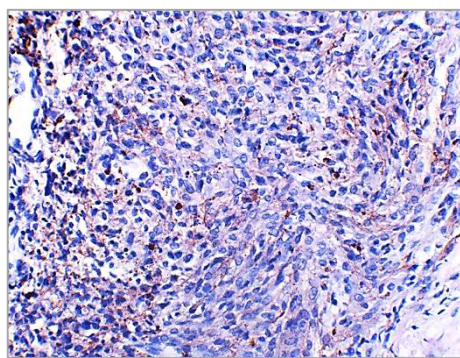
- **Auftragen des Sekundärantikörpers**
 - Inkubation *20 Minuten*
 - Entfernung mit Waschpuffer *2 x 5 Minuten*
- **Auftragen des Streptavidin-Biotin-Komplexes**
 - Inkubation *20 Minuten*
 - Entfernung mit Waschpuffer *2 x 5 Minuten*
- **Ansetzen des Chromogens** nach Herstellerangaben
- **Auftragen des Chromogens**
 - Inkubation *10 Minuten*
- **Stoppen der Färbung** in destilliertem Wasser

3.6. Gegenfärbung und Einbettung

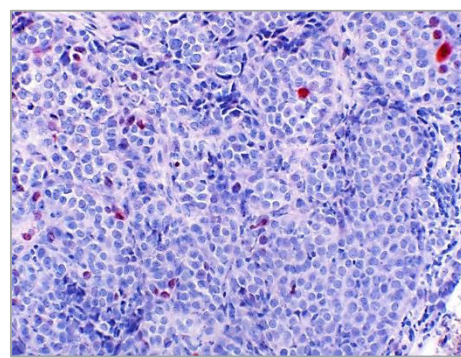
Es erfolgte eine Gegenfärbung der Zellkerne, um einen Kontrast zum umliegenden Gewebe herzustellen. Dazu wurden die Schnitte für 30 Sekunden in saurem Hämalun nach P. Mayer (hauseigene Apotheke) inkubiert und anschließend unter warmem fließendem Wasser gebläut. Nach der Gegenfärbung erfolgte die Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe und die Einbettung in Malinol (Firma Walddeck, Deutschland).

3.7. Histopathologische Beurteilung und Dokumentation

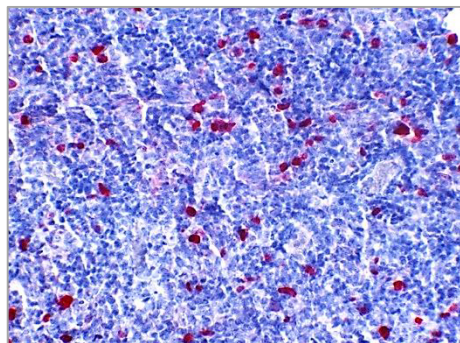
Die immunhistochemische Färbung wurde von zwei unabhängigen Ärzten optisch mit Hilfe eines Zeiss-Fotomikroskops (Carl-Zeiss, Deutschland) bewertet sowie fotodokumentiert. Die Beurteilung erfolgte semiquantitativ nach Färbeintensität sowie Anzahl der positiv gefärbten Zellen anhand einer Skala von 0 bis 3, wobei Grad 0 einem negativen Ergebnis, Grad 1 einer geringen Färbeintensität bzw. vereinzelter gefärbter Zellen, Grad 2 einer deutlich positiven Färbung und Grad 3 einer besonders ausgeprägten Färbung entsprach.



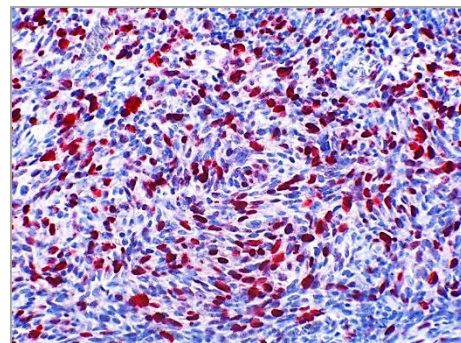
Grad 0



Grad 1



Grad 2



Grad 3

Abb. 12: Exemplarische Darstellung der Beurteilungsgrade für die Intensität der immunhistochemischen Färbung

IV. STATISTIK

Die erhobenen Daten wurden mit Hilfe der Software SPSS für Windows 16 der Firma SPSS Inc. statistisch ausgewertet. Der klinischen Relevanz entsprechend wurden folgende Paarvergleiche gezogen: PAM ohne Atypien versus PAM mit Atypien, PAM mit Atypien versus maligne Melanome sowie maligne Melanome versus Bindehautnaevi. Dabei kamen der Exakte Test nach Fisher sowie der Mann-Whitney-U-Test zum Einsatz. Anschließend wurde eine Bonferroni-Korrektur durchgeführt, um der Alphafehler-Kumulierung bei multiplen Paarvergleichen am gleichen Grunddatensatz gerecht zu werden. Außerdem erfolgte eine lineare Diskriminanzanalyse hinsichtlich möglicher Markerkombinationen. Als Signifikanzniveau wurde ein angenommener Fehler erster Art von höchstens 5 Prozent ($p \sim 0,05$) festgelegt.

V. ERGEBNISSE

1. Immunhistochemische Untersuchung mit dem Marker S-100

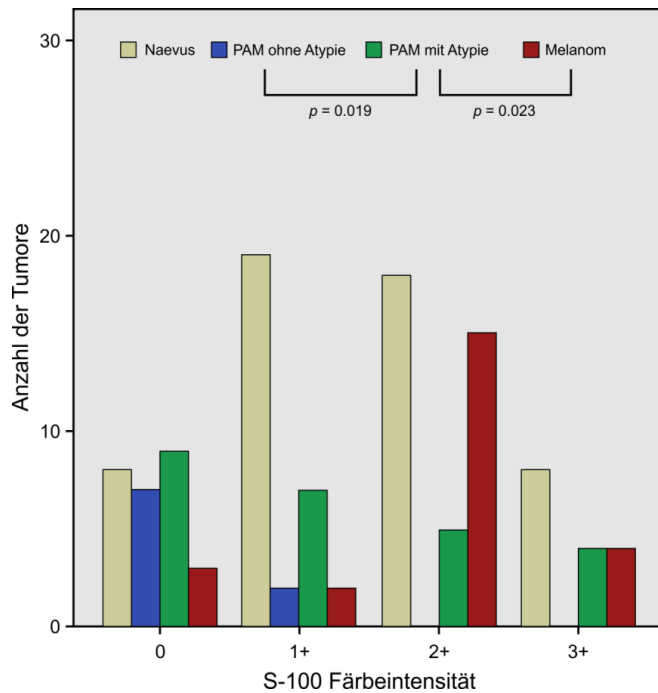


Abb. 13: Färbeverhalten für den immunhistochemischen Marker S-100

Die immunhistochemische Untersuchung mit dem melanozytären Marker S-100 zeigte einen hochsignifikanten Unterschied im Färbeverhalten zwischen PAM ohne und PAM mit Atypie ($p = 0,019$).

Während in der Gruppe der PAM ohne Atypie keine oder eine nur geringe Färbung (Grad 1) für S-100 auftrat (siehe Abbildung 14a), zeigte sich in der Gruppe der PAM mit Atypie eine deutlich intensivere Färbung mit einem großen Anteil der Fälle im Bereich von Grad 2 und 3 und lediglich einem geringen Anteil ohne Färbung mit diesem Marker (siehe Abbildung 14b).

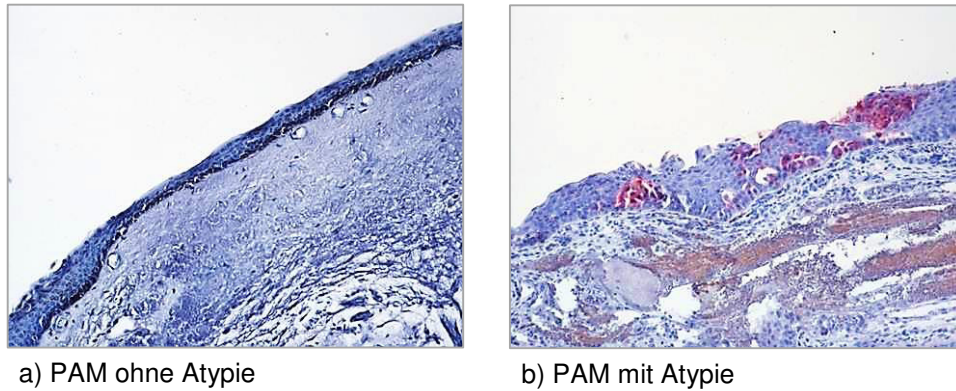


Abb. 14: Immunhistochemie Marker S-100 a) PAM ohne Atypie, b) PAM mit Atypie

Beim Vergleich der malignen Melanome mit der Gruppe der PAM mit Atypien konnte ebenfalls ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden ($p = 0,023$).

Maligne Melanome zeigten eine deutlich intensivere Färbung mit S-100 im Vergleich zu den PAM mit Atypie. Nur einzelne Fälle zeigten keine Färbung.

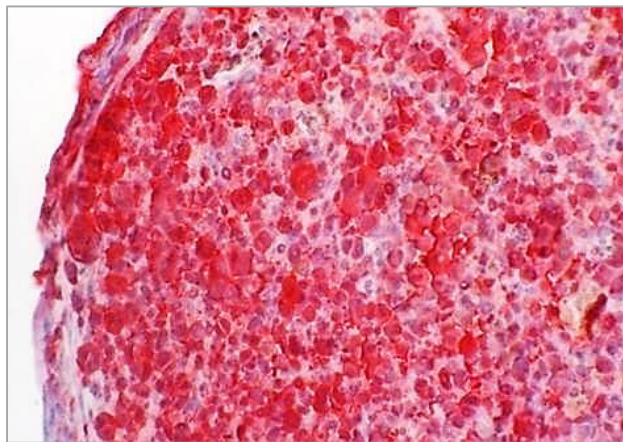


Abb. 15: Immunhistochemie Marker S-100, malignes Melanom der Bindehaut

Zwischen den Gruppen der Bindehautnaevi und der malignen Melanome zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Färbung mit S-100.

2. Immunhistochemische Untersuchung mit dem Marker HMB-45

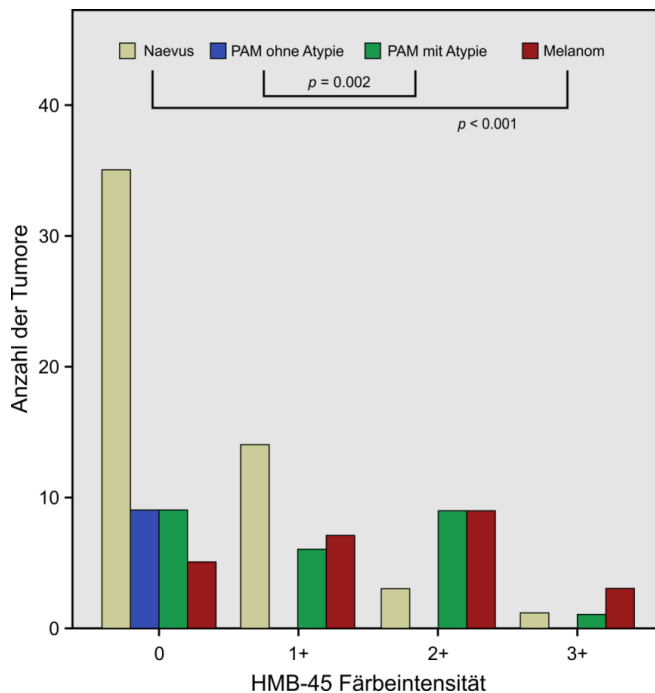


Abb. 16: Färbeverhalten für den immunhistochemischen Marker HMB-45

Die immunhistochemische Analyse mit dem Marker HMB-45 ergab ebenfalls hochsignifikante Unterschiede im Färbeverhalten zwischen PAM ohne Atypie im Vergleich zu den PAM mit Atypie ($p = 0,002$).

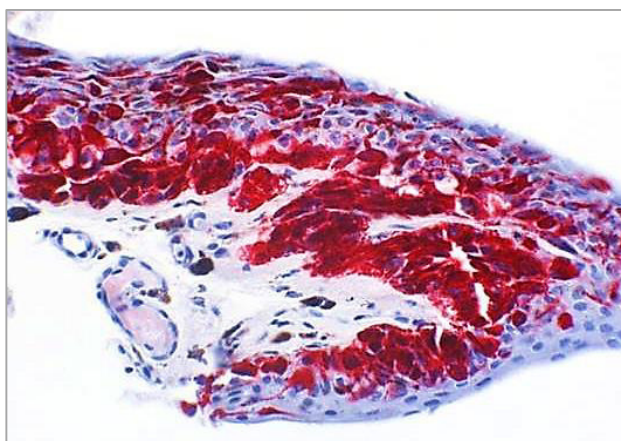


Abb. 17: Immunhistochemie Marker HMB-45, PAM mit Atypie

Dabei zeigte sich in keinem der in unserer Studie untersuchten Fälle von PAM ohne Atypie eine positive Färbung mit HMB-45, wohingegen 64% der PAM mit Atypie diesen Marker in verschiedener Intensität aufwiesen.

Des Weiteren beobachteten wir im Paarvergleich zwischen der Gruppe der malignen Melanome und der Bindehautnaevi signifikant häufiger eine positive Färbung mit HMB-45 von Seiten der Melanome ($p = 0,001$).

Zwischen den PAM mit Atypie und den malignen Melanomen zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Färbeverhalten mit diesem Marker.

3. Immunhistochemische Untersuchung mit dem Marker Melan-A

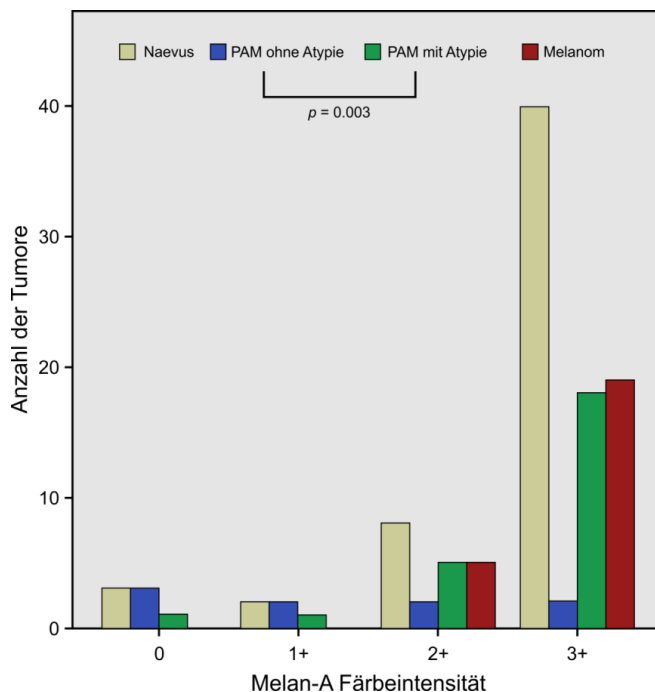


Abb. 18: Färbeverhalten für den immunhistochemischen Marker Melan-A

Nach immunhistochemischer Färbung mit dem Marker Melan-A zeigten die Fälle der PAM mit Atypie signifikant häufiger positive Ergebnisse mit intensiver Färbung im Vergleich zu den PAM ohne Atypie ($p = 0,003$).

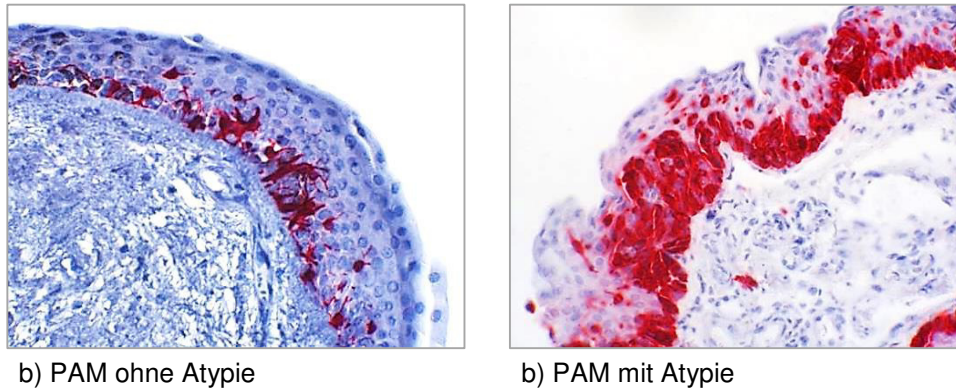


Abb. 19: Immunhistochemie Marker Melan A, a) PAM ohne Atypie, b) PAM mit Atypie

Zwischen den anderen untersuchten Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Färbeverhalten mit dem Marker Melan-A.

4. Immunhistochemische Untersuchung mit dem Marker CD3

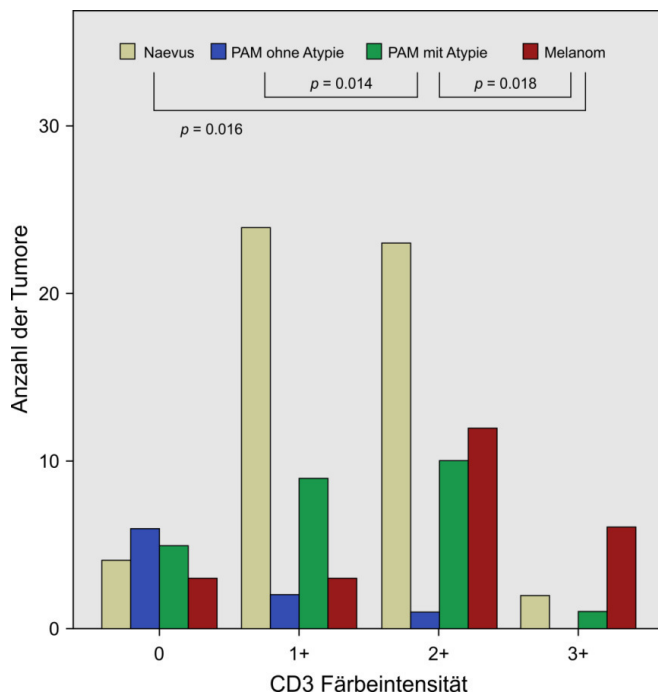


Abb. 20: Färbeverhalten für den immunhistochemischen Marker CD3

Bei der immunhistochemischen Untersuchung mit dem Marker CD3 zeigten signifikant mehr Fälle von malignen Melanomen eine positive und intensive Färbung im Sinne einer entzündlichen Begleitreaktion verglichen mit der Gruppe

der Bindehautnaevi ($p = 0,016$) und der Gruppe der PAM mit Atypie ($p = 0,018$). Die gleiche Beobachtung gilt für die Fälle der PAM mit Atypie im Vergleich zu den PAM ohne Atypie ($p = 0,014$). Abbildung 21 zeigt beispielhaft die immunhistochemische Färbung eines Bindehautnaevus im Vergleich zu einem malignen Melanom.

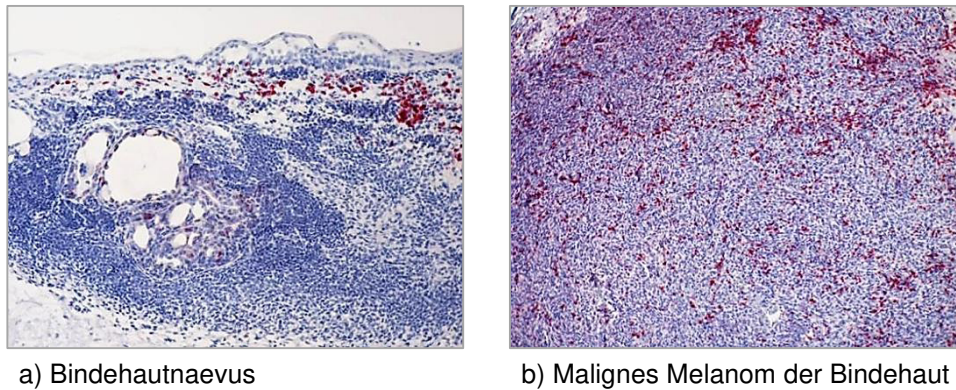


Abb. 21: Immunhistochemie Marker CD3, a) Bindehautnaevus, b) malignes Melanom der Bindehaut

5. Immunhistochemische Untersuchung mit dem Marker CD68

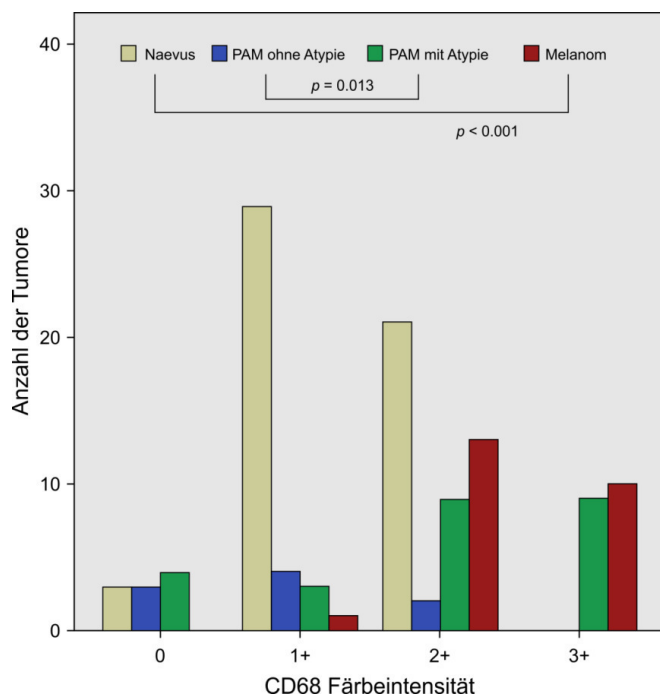


Abb. 22: Färbeverhalten für den immunhistochemischen Marker CD68

Eine histiozytäre Begleitreaktion, nachgewiesen durch die immunhistochemische Färbung mit dem Marker CD68, wurde signifikant häufiger in der Gruppe der malignen Melanome im Vergleich zu den Bindehautnaevi beobachtet ($p < 0,001$).

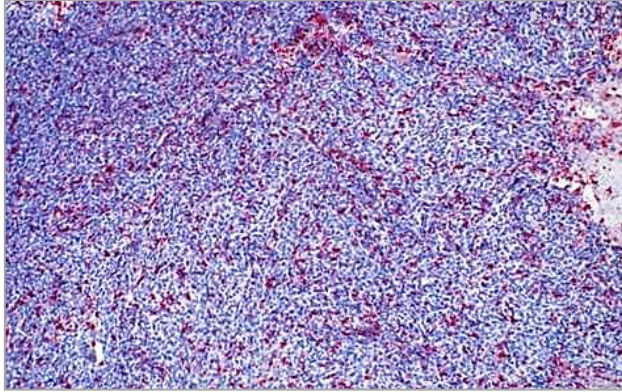
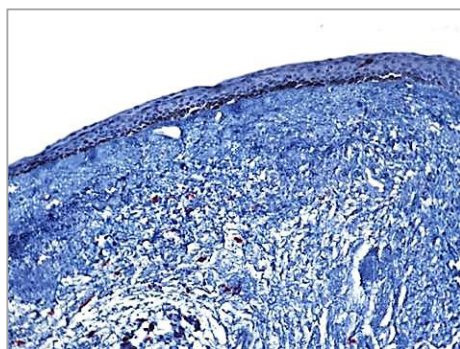


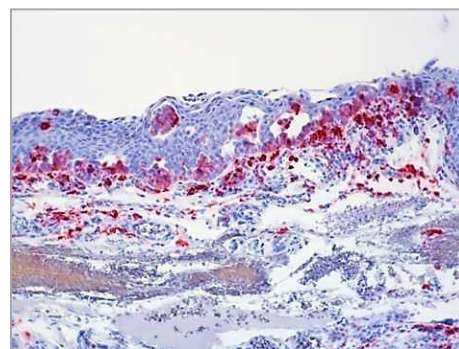
Abb. 23: Immunhistochemie Marker CD68, malignes Melanom der Bindehaut

Der Großteil der malignen Melanome wies eine ausgeprägte Färbung von Grad 2 und Grad 3 auf.

Ebenso zeigten signifikant mehr PAM mit Atypie eine Färbung mit diesem Marker als PAM ohne Atypie ($p = 0,013$). Auch hier waren Färbegrade von 2 und 3 unter den PAM mit Atypie in der Überzahl.



a) PAM ohne Atypie



b) PAM mit Atypie

Abb. 24: Immunhistochemie Marker CD68, a) PAM ohne Atypie, b) PAM mit Atypie

Zwischen den Fällen der malignen Melanome und den PAM mit Atypie bestand kein signifikanter Unterschied.

6. Immunhistochemische Untersuchung mit dem Marker Ki67

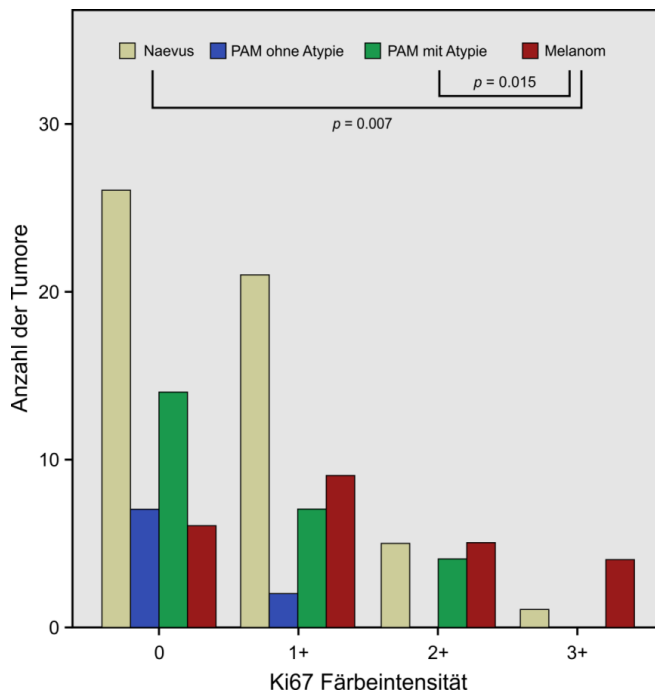
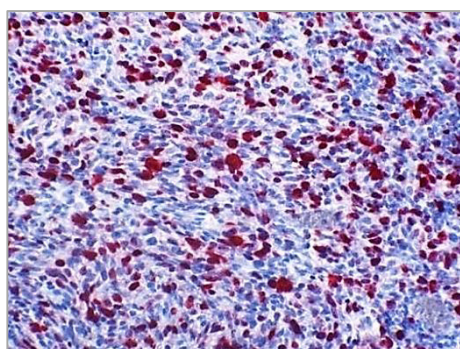
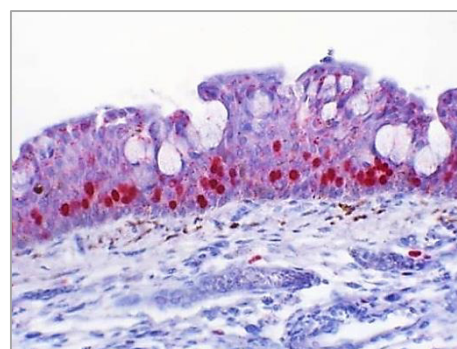


Abb. 25: Färbeverhalten für den immunhistochemischen Marker Ki67

Der Proliferationsmarker Ki67 wurde signifikant häufiger in der Gruppe der malignen Melanome nachgewiesen als unter den Bindehautnaevi ($p = 0,007$) oder den PAM mit Atypie ($p = 0,015$).



a) Malignes Melanom



b) PAM mit Atypie

Abb. 26: Immunhistochemie Marker Ki67, a) malignes Melanom der Bindehaut, b) PAM mit Atypie

Beim Vergleich der PAM mit und ohne Atypie ergab sich kein signifikanter Unterschied.

7. Ergebnisse der linearen Diskriminanzanalyse

Mit der Frage nach potentiellen Markerkombinationen zur Differenzierung melanozytärer Bindehautläsionen wurde eine lineare Diskriminanzanalyse durchgeführt. Dabei wurde die anhand der Daten erstellte Funktion am identischen Datensatz geprüft.

Die Analyse ergab eine 85,3 prozentige Wahrscheinlichkeit der korrekten Unterscheidung zwischen Fällen der benignen PAM ohne Atypie und der potentiell malignen PAM mit Atypie durch Kombination der Marker HMB-45, Melan-A und S-100.

Eine immunhistochemische Untersuchung mit den Markern S-100, Ki67 sowie CD68 erlaubte anhand unserer Daten in 69,4 % der Fälle eine korrekte Differenzierung zwischen PAM mit Atypie und malignen Melanomen.

In 70,1 % der Fälle war es möglich, allein mit dem Marker HMB-45 Bindehautnaevi von malignen Melanomen zu unterscheiden.

VI. DISKUSSION

1. Stellenwert der immunhistochemischen Untersuchung in der heutigen Tumordiagnostik

Die immunhistochemische Untersuchung ist eine in der diagnostischen Pathologie bereits seit langem angewandte Technik (50,51). Die Möglichkeit, Moleküle in situ im Gewebe darzustellen hat die histopathologische Diagnostik in den letzten Jahrzehnten revolutioniert (52,53). Dabei hat sich die Immunhistochemie aus Ihrem Nischendasein an hoch spezialisierten Zentren zu einem Stützpfeiler der an öffentlichen Krankenhäusern durchgeführten Diagnostik entwickelt (52). Das vornehmliche Anwendungsgebiet stellt die Diagnostik und Klassifikation von Tumoren dar, die sich die Darstellung zellulärer Komponenten und gewebespezifischer Antigene zu Nutze macht, insbesondere im Falle wenig differenzierter Malignome, bei Tumoren unbekannten Ursprungs oder Metastasen (52,53,54). In zunehmendem Maße dient die immunhistochemische Untersuchung jedoch auch als Basis für prognostische Aussagen und Therapieentscheidungen, ein Beispiel hierfür ist die Untersuchung auf HER2/neu oder auf Positivität für Östrogenrezeptoren beim Mammakarzinom (52). Damit geht eine große Verantwortung einher, der bei der Durchführung und Interpretation immunhistochemischer Färbungen Sorge getragen werden muss. Denn neben Fallstricken auf technischer Ebene wie Fixation und Aufarbeitung des Gewebes und Verfälschungen der Färbung durch endogene Enzymaktivität, bedarf die Interpretation großer Erfahrung, zumal evidenzbasierte Kriterien zur Beurteilung noch fehlen (54). Eine quantitative Aussage über den Proteingehalt ist mit Hilfe der Immunhistochemie nicht möglich, ebensowenig können Proteinmodifikationen und somit dessen Aktivität bestimmt werden (53).

Nichtsdestotrotz können circa 90 % der Tumoren, die bei rein morphologischer Betrachtung diagnostische Schwierigkeiten bereiten, anhand einer immunhistochemischen Untersuchung korrekt klassifiziert werden (34,55,56,57). Aufgrund der hohen Kosten gilt die Empfehlung, nur nach ausführlicher histopathologischer Untersuchung gezielt mit ausgewählten Markern Differentialdiagnosen abzugrenzen und, wenn nötig, erst im Anschluss weitere Marker zu testen (52).

Maligne Melanome können histologisch sehr variable Befunde zeigen und Merkmale einer Vielzahl von Tumoren aufweisen, weshalb hier die Immunhistochemie von entscheidendem Nutzen sein kann (34,35,52). Ebenso verhält es sich mit den konjunktivalen melanozytären Läsionen, wie bereits eingehend ausgeführt wurde. Umso dringender der Bedarf an Markern, die eine eindeutige Diagnosestellung ermöglichen. Ziel unserer Studie war es, zu untersuchen, inwiefern mit Hilfe melanozytärer Marker sowie Markern für Inflammation und Proliferation, einzeln oder in Kombination, eine Differenzierung zwischen benignen, potentiell malignen und malignen Bindehautläsionen möglich ist. Dabei wurden gemäß der klinischen Relevanz sowie der unserer Erfahrung nach histopathologisch herausfordernden Konstellationen Paarvergleiche gezogen. Dies ermöglicht es, Unterschiede in Färbehäufigkeit und –Intensität für verschiedene Marker bezüglich der im klinisch-/pathologischen Alltag häufig auftretenden Fragestellungen darzustellen. So wurden die Färbecharakteristika anhand von Paarvergleichen analysiert: Bindehautnaevi versus Bindehautmelanom, PAM ohne Atypie versus PAM mit Atypie sowie PAM mit Atypie versus Bindehautmelanom.

2. Immunhistochemische Differenzierung anhand melanozytärer Marker

2.1. S-100

Der Antikörper S-100 gilt im Allgemeinen mit seiner hohen Sensitivität von 97 bis 100%, sowohl bei Primärtumoren als auch bei Metastasen (34,35,58,59,60), als Screeningmarker für maligne Melanome (34,35,58,59,60). Jedoch reagiert dieser Antikörper ebenfalls mit nicht-melanozytären Strukturen, wie peripheren Nervenscheiden, myoepithelialen Zellen, Adipozyten, Chondrozyten und Langerhanszellen und deren Tumoren (59,61), so dass die Kombination mit einem spezifischeren Marker zur Diagnosesicherung empfohlen wird (34). Auch melanozytäre Läsionen der Bindehaut sind mit diesem Marker gut darstellbar (36,37,38,62,63,64). Für maligne Melanome der Bindehaut wird eine Sensitivität von 87-100% angegeben (36,37,38,39). Dem überwiegenden Teil der Studien zufolge identifiziert dieser Marker jedoch sowohl benigne als auch maligne Melanozyten (37,38,42,63,64).

Lediglich Keijser et al. fanden Hinweise darauf, dass der Subtyp S-100A1 konjunktivale Naevi von konjunktivalen Melanomen differenzieren könnte, wiesen jedoch auf die geringe Fallzahl hin und schlussfolgerten, dass der allgemein erhältliche S-100 Antikörper wohl dem in ihrer Studie getesteten Subtyp S-100B entspräche. Hier war, in Einklang mit vorangegangenen Studien, kein signifikanter Unterschied zwischen Naevi und malignen Melanomen der Bindehaut nachweisbar. Jedoch wurde eine geringere Anfärbung der untersuchten PAM mit S-100B im Vergleich beobachtet. Im Unterschied zu unserer Studie bildeten PAM mit und ohne Atypie eine Gruppe und wurden nicht separat ausgewertet (62).

Die Ergebnisse für S-100B stehen im Einklang mit unseren Untersuchungen, in denen ein Standard-Marker für S-100 verwendet wurde. Auch wir fanden keinen signifikanten Unterschied zwischen Bindehautmelanomen und Naevi für den Marker S-100.

In Übereinstimmung mit Keijser et al. zeigte auch unsere Studie eine verminderte Färbung der primär erworbenen Melanosen im Vergleich zu anderen Läsionen bezüglich S-100. Wir fanden hochsignifikante Unterschiede im Färbeverhalten im Paarvergleich zwischen PAM ohne Atypie und PAM mit Atypie sowie zwischen Bindehautmelanomen und PAM mit Atypie. PAM mit Atypie reagierten häufiger sowie stärker positiv mit S-100 als die Gruppe der PAM ohne Atypie – ebenso verhielt es sich mit den Bindehautmelanomen im Vergleich zu den PAM mit Atypie.

In der Studie von Steuhl et al. zeigte sich ebenfalls eine tendenziell niedrigere Expression von S-100 auf der Seite der Melanosen im Vergleich zu den Melanomen, jedoch ohne statistische Signifikanz. Hier wurden lediglich PAM ohne Atypie untersucht, so dass ein direkter Vergleich zu unserer Studie nicht möglich ist (37).

Obwohl sowohl benigne als auch maligne Melanozyten eine positive Färbung mit S-100 aufweisen können, so waren in unserer Studie doch im Paarvergleich die Anzahl der positiven Fälle als auch die Intensität der Färbung signifikant unterschiedlich zwischen PAM mit und ohne Atypie, sowie zwischen PAM mit Atypie und den malignen Melanomen. Daraus wird gefolgert, dass die Färbung mit S-100 zur Unterscheidung zwischen benignen und malignen melanozytären Prozessen der Bindehaut beitragen kann, wenn auch nicht als alleinstehender

Tumormarker, sondern in Zusammenschau mit dem histopathologischen Bild und nach Interpretation durch einen erfahrenen Untersucher.

2.2. HMB-45

HMB-45 wurde als spezifischer Marker für melanozytäre Tumore entwickelt (41). Häufig wird dieser Marker in Kombination mit dem sehr sensitiven S 100 angewandt, um den melanozytären Ursprung einer Läsion zu bestätigen (34). Die Attraktivität dieses Markers liegt in der Vorstellung, dass gezielt stimulierte und proliferierende Melanozyten mit HMB-45 identifiziert werden können (65). Dafür spricht, dass der Marker kutane Melanomzellen, ebenso wie junctionale Naevuszellen, Spitznaevi und atypische melanozytären Hyperplasien der Haut positiv färbt, jedoch nicht mit intradermalen Naevi der Haut und normalen Melanozyten des Erwachsenen reagiert (41). Gown et al. sprachen dem Marker eine absolute Spezifität für melanozytäre Tumore der Haut zu, kombiniert mit einer Sensitivität von 97% (41). Auch Wick et al. konnten eine Spezifität von 100% sowie eine Sensitivität von 93% für das maligne Melanom der Haut nachweisen (66). Smoller et al. konstatierten eine positive Färbung von stimulierten Melanozyten mit dem Marker HMB-45, beispielsweise im Bereich von Granulationsgewebe (65). Inzwischen wurden auch andere Tumore als HMB-45 positiv beschrieben, darunter Angiomyolipome, Schweißdrüsentumore und meningeale Melanozytome, wovon die Mehrzahl jedoch histopathologisch gut von Melanomzellen abgrenzbar sind, weswegen die Spezifität von HMB-45 weiterhin als hoch eingeschätzt wird - insbesondere, da es typischerweise nicht in Karzinomen, Lymphomen oder Sarkomen exprimiert wird (34,35).

Hinsichtlich der Sensitivität von HMB-45 bei malignen Melanomen der Bindehaut finden sich Zahlen von 72-96% (36,38,39,42). Die Spezifität für maligne Melanome der Konjunktiva wird von Hitzler et al. mit 51,5% angegeben und liegt damit deutlich unter den Werten für kutane Melanome (38).

Es bleibt also unklar, ob HMB-45 im Bereich der melanozytären Bindehautläsionen benigne von potentiell malignen und malignen Läsionen sicher abzugrenzen vermag.

Glasgow et al. widmeten sich 1990 diesem Thema und kamen zu dem Schluss, dass mit HMB-45 keine Unterscheidung zwischen gutartigen und bösartigen melanozytären Läsionen der Bindehaut möglich sei, da sich auch benigne subepitheliale Naevi und benigne PAM mit diesem Marker anfärben ließen. Es wurde eine ausgeprägtere Färbung der konjunktivalen malignen Melanome im Verhältnis zu den Bindehautnaevi beobachtet, jedoch nicht nähergehend ausgewertet. Die untersuchten Compound-Naevi zeigten eine Betonung der Färbung im Bereich der junktionalen Komponente. Diese „Nebenbefunde“ deuten auf die Anfärbbarkeit aktivierter Melanozyten mit diesem Marker hin, die auch im dermatologischen Bereich beschrieben wurde (67).

Kurz darauf publizierte die Gruppe um K.-P. Steuhl ähnliche Ergebnisse. Hier zeigten die untersuchten, primär gutartigen melanozytären Prozesse ebenfalls ein charakteristisches Expressionsmuster für HMB-45 mit Betonung auf den Bereich der intraepithelialen und junktionalen Komponente der Läsion. Die untersuchten malignen Melanome wiesen neben einer positiven intraepithelialen und junktionalen Färbung in 91% der Fälle ebenfalls zu 88% eine Färbung des tiefen subepithelialen Anteils mit über 50% positiven Zellen auf. Dies und die Tatsache, dass zytologisch besonders maligne Melanomzellen eine intensivere Färbung aufwiesen, brachte die Autoren zu dem Schluss, dass HMB-45 zumindest einen Anhalt auf die „relative“ Malignität eines Tumors geben und hilfreich bei der Beurteilung der Tumorausdehnung bzw. der Tumorfreiheit der Schnittkanten des Exzidats sein könnte (37).

Dem stehen wiederum Untersuchungen von Mc Donnell et al. entgegen, die zwar in 82,6% eine positive Anfärbung der Melanome mit HMB-45 fanden, jedoch in sehr variabler Ausprägung. Dies wird mit unterschiedlichen Differenzierungsgraden innerhalb des Tumors in Zusammenhang gesetzt. Obwohl in dieser Studie die meisten PAM nicht positiv mit HMB-45 färbten und auch lediglich einer von 11 untersuchten Naevi eine Färbung mit diesem Marker zeigte, konnte aufgrund der geringen Fallzahlen, insbesondere der PAM, keine sichere Aussage dahingehend getroffen werden, ob mit HMB-45 gutartige von bösartigen melanozytären Bindehautläsionen unterschieden werden können (39).

Trotz größerer Fallzahlen fanden Hitzer et al. für den Marker HMB-45 lediglich eine Spezifität von 51,5 % hinsichtlich konjunktivaler maligner Melanome und

somit kein Potential, maligne von benignen melanozytären Bindehautläsionen abzugrenzen (38).

Unsere Ergebnisse zeigen im Paarvergleich von PAM mit und ohne Atypie hochsignifikante Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen. Keine der untersuchten PAM ohne Atypie färbte positiv mit HMB-45. Dahingegen ließen sich 64 % der PAM mit Atypie in unterschiedlicher Intensität mit diesem Marker anfärben, was die Theorie von der Markierung proliferierender, aktivierter Melanozyten durch HMB-45 unterstreicht. Ebenso zeigten die malignen Melanome der Bindehaut deutlich häufiger eine positive Färbung mit diesem Marker als die gutartigen Naevi. Eine Färbung der Naevi durch HMB-45 kann durch das Vorhandensein aktivierter Melanozyten in diesen Läsionen, insbesondere in der junktionalen Zone erklärt werden. Wobei die Lokalisation der Färbung entsprechend dem Studiendesign nicht näher differenziert wurde. Im Paarvergleich der PAM mit Atypie mit den malignen Melanomen zeigte sich kein signifikanter Unterschied, gemäß der Tatsache, dass es sich in beiden Läsionen um aktivierte, proliferierende Melanozyten handelt, die malignes Potential besitzen oder bereits eine maligne Transformation durchlaufen haben.

Unsere Ergebnisse untermauern und ergänzen die Beobachtungen von Jacobiec et al., die veröffentlicht wurden, während sich die vorliegende Studie in Arbeit befand und nachdem erste Ergebnisse dieser Studie auf der ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) - Konferenz präsentiert worden waren (63,68). Hier wurden 20 konjunktivale Naevi und 15 invasive Bindehautmelanome – größtenteils in Kombination mit PAM - hinsichtlich ihrer Reaktion mit verschiedenen immunhistochemischen Markern untersucht. Trotz der Unterschiede im Studiendesign zeigte sich kongruent zu unseren Ergebnissen eine intensivere Färbung der Melanoma in situ und PAM mit Atypie mit dem Marker HMB-45 im Vergleich zu benignen intraepithelialen junktionalen Naevuszellen, wobei insbesondere eine positive Färbung der subepithelialen Komponente von den Autoren als Anhalt für das Vorliegen eines malignen Prozesses gewertet wird. Die immunhistochemische Analyse mit HMB-45 gebe eine zusätzliche Sicherheit bei der Beurteilung dieser Läsionen (63).

Die in unserer Studie nachgewiesenen Unterschiede im Färbeverhalten von benignen und malignen/potentiell malignen melanozytären Bindehautläsionen für

HMB-45 unterstreichen das diagnostische Potential dieses Markers. Da es jedoch sowohl Naevi mit positiver Färbung für HMB-45 in unserer Studie gab, als auch maligne Melanome der Bindehaut, die negativ für HMB-45 waren, kann hier allein mittels der Immunhistochemie keine absolute Differenzierung erreicht werden. In Zusammenschau mit den histopathologischen Befunden ist HMB-45 jedoch unserer Meinung nach eine sinnvolle Ergänzung der Diagnostik, die insbesondere in Grenzfällen wichtige Hinweise zur Diagnosestellung und –sicherung geben kann.

2.3. Melan-A

Melan-A ist einer von zwei existierenden Klonen eines Antikörpers gegen ein von T-Zellen erkanntes zytoplasmatisches Protein der melanosomalen Differenzierung. Der zweite Klon dieses Antikörpers ist unter dem Namen MART-1 bekannt (43,44,45). In dermatologischen Studien erreichte Melan-A eine Sensitivität von 75-92% sowie eine Spezifität von 95-10%, vergleichbar mit HMB-45 (34,35).

Heegaard et al. beschreiben eine Sensitivität von 100% für maligne Melanome der Bindehaut, die Spezifität wurde in dieser Studie nicht untersucht (36). In einer Studie von Keijser et al. färbte Melan-A negativ in 7 von 16 Fällen maligner Melanome der Bindehaut und zeigte eine höhere Affinität zu PAM und Bindehautnaevi (62). Jakobiec et al. beobachteten eine eine verlässliche und intensive Färbung melanozytärer Zellen mit MART-1, jedoch sowohl in benignen als auch malignen Läsionen (63).

Auch in unserer Studie ließ sich lediglich in einem der Paarvergleiche ein signifikanter Unterschied in der immunhistochemischen Reaktion mit Melan-A nachweisen. In der Gruppe der PAM mit Atypie zeigten sich signifikant häufiger positive sowie intensivere Färbung als in der Gruppe der PAM ohne Atypie. Da Melan-A ein Antigen der melanosomalen Differenzierung ist, könnte dies einen Unterschied der Differenzierung der Melanozyten in diesen Läsionen widerspiegeln. In diesem Zusammenhang könnte auch die hohe Anzahl der für Melan-A positiven Bindehautnaevi mit hohen Färbegraden gesehen werden, im Sinne eines möglicherweise geringeren Reifegrades der Naevuszellen. Infolgedessen zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Paarvergleich zwischen Bindehautnaevi und malignen Melanomen der Bindehaut, da auch die Gruppe der

malignen Melanome stark positiv mit Melan-A reagierte, ebenfalls einem geringen Grad an Differenzierung entsprechend.

In Zusammenschau der Studienlage mit unseren Ergebnissen ist Melan-A damit ein Marker, der der Identifizierung und Darstellung melanozytärer Bindehautläsionen dienlich ist, jedoch keine Unterscheidung zwischen benignen, potentiell malignen und malignen Prozessen leisten kann.

3. Immunhistochemische Differenzierung anhand der inflammatorischen Marker CD3 und CD68

Im Kontext sowie gutartiger als auch bösartiger melanozytärer Bindehautläsionen ist häufig eine mehr oder weniger starke Infiltration mit entzündlichen Zellen zu beobachten. Anastassiou et al. fanden in nahezu allen von ihnen untersuchten malignen Melanomen der Bindehaut entzündliche Zellen, darunter in 26 von 32 Tumoren CD3 positive T-Zellen sowie in 33 von 34 Fällen CD68 positive Makrophagen (47). Eine Assoziation zwischen Prognose und entzündlicher Infiltration wurde in dieser Studie nicht beobachtet. Auch Hitzer et al. fanden diesbezüglich keinen Zusammenhang (38).

Unsere Ergebnisse zeigen eine signifikant stärkere Infiltration potentiell maligner und maligner melanozytärer Bindehautläsionen mit CD3 positiven Zellen. Die Paarvergleiche malignes Melanom versus Naevi, malignes Melanom versus PAM mit Atypie und PAM mit Atypie versus PAM ohne Atypie fielen allseits „zugunsten“ der (potentiell) maligneren Läsion aus.

Auch bezüglich der histiozytären Begleitreaktion in Form CD68 positiver Zellen zeigte sich eine signifikant ausgeprägtere Reaktion der malignen Melanome im Vergleich zu den Bindehautnaevi, als auch der PAM mit Atypie verglichen mit PAM ohne Atypie.

Eine starke Immunreaktion kann somit einen Hinweis auf (potentiell) maligne Läsionen sein. Da jedoch auch gutartige Bindehautläsionen eine inflammatorische Begleitreaktion aufweisen können, ist wiederum die histopathologische Analyse durch einen erfahrenen Untersucher unabdingbar.

4. Immunhistochemische Differenzierung anhand Ki 67 als Marker für Zellproliferation

Ki67 ist ein aus der Tumorphathologie bekannter Marker für Proliferation. Als nucleäres Antigen ist Ki67 in allen aktiven Phasen des proliferativen Zellzyklus vorhanden, während es in der Ruhephase nicht nachweisbar ist (49). Dermatologische Studien attestieren diesem Marker eine Korrelation mit der Malignität melanozytärer Läsionen der Haut und somit das Potential, eine Unterscheidung zwischen Naevi und malignen Melanomen zu erlauben (69,70). Und auch hinsichtlich der melanozytären Bindehautläsionen gibt es Hinweise auf eine solche Korrelation. Chowers et al. konnten beispielsweise eine signifikant stärkere Färbung von PAM mit Atypie im Vergleich zu PAM ohne Atypie mit diesem Marker nachweisen (71). Jacobiec et al. fanden einen signifikant höheren Ki67 Index bei malignen Melanomen der Bindehaut im Vergleich zu Bindehautnaevi (63). Auch in unserer Studie zeigten die malignen Melanome eine deutlich stärkere Reaktion mit diesem Marker im Paarvergleich mit den gutartigen Naevi und den PAM mit Atypie, was diese Beobachtungen bestätigt. Die immunhistochemische Untersuchung mittels Ki67 ist somit ein hilfreiches Mittel zur Differenzierung melanozytärer Bindehauttumore, wenn auch die histopathologische Beurteilung dadurch nicht ersetzt werden kann.

5. Lineare Diskriminanzanalyse

In Zusammenschau unserer Ergebnisse mit der Studienlage scheint es durchaus immunhistochemische Marker zu geben, die bei der Differenzierung melanozytärer Bindehautläsionen hilfreich sind und Hinweise auf ein (potentiell) malignes Geschehen geben. Einzeln gesehen konnte jedoch keiner der getesteten Marker eine scharfe Linie zwischen benignen, potentiell malignen und malignen Prozessen ziehen.

Somit stellt sich die Frage, ob sich mittels einer Kombination verschiedener Marker die Aussagekraft der immunhistohemischen Untersuchung erhöhen lässt.

Uguen et al. schlagen beispielsweise ein Scoring-System basierend auf einer Kombination aus drei Markern zur Differenzierung zwischen Naevi und malignen

Melanomen der Haut vor, bestehend aus p16, einem regulatorischen Zellzyklusprotein, Ki67 und HMB-45 (72). Auch immunhistochemische Doppelfärbungen mit Ki67/MART-1 und HMB 45/MITF wurden erfolgreich zur Unterscheidung zwischen Naevi und malignen Melanomen der Haut eingesetzt (73). Bezüglich melanozytärer Läsionen der Bindehaut sind uns bisher keine Ansätze oder Daten diesbezüglich bekannt.

Wir untersuchten unsere erhobenen Daten hinsichtlich der Wahrscheinlichkeit, mit einer Kombination von Markern die untersuchten Fälle korrekt ihrer Diagnose zuzuteilen. Mit einer Kombination von HMB-45, Melan-A und S-100 konnte somit in 85,3% der Fälle korrekt zwischen PAM mit und ohne Atypie unterschieden werden. Bezüglich der Differenzierung zwischen malignem Melanom und PAM mit Atypie erwies sich die Kombination aus Ki67, CD68 und S-100 mit einer Wahrscheinlichkeit von 69,4% richtiger Einordnung als erfolgsversprechend. Hervorzuheben ist, dass HMB-45 als alleiniger Marker zu einer korrekten Einordnung von Bindehautnaevi und Melanomen in 70% führte.

Dabei ist anzumerken, dass im Rahmen der durchgeführten linearen Diskriminanzanalyse eine anhand der Daten erstellte Funktion am identischen Datensatz geprüft wurde. Dies gibt eine eindeutige Tendenz an, ist jedoch mit eingeschränkter Aussagekraft der Ergebnisse im Vergleich zur Prüfung der Funktion an einem unabhängigen Datensatz verbunden. Weitere Studien zur Einschätzung von Markerkombinationen sind daher erforderlich, um nähere Aussagen beziehungsweise Empfehlungen diesbezüglich treffen zu können.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Die Differenzierung melanozytärer Bindehautläsionen bereitet nicht nur dem Kliniker, sondern auch dem Histopathologen oft erhebliche Schwierigkeiten. 53 Bindehautnaevi, 9 primär erworbene Melanosen (PAM) ohne Atypie, 25 PAM mit Atypie und 24 Bindehautmelanome wurden mit der Labeled (Strept-)Avidin-Biotin-Methode immunhistochemisch analysiert.

Zur Anwendung kamen Antikörper gegen melanozytäre Zellen (S-100, HMB-45, Melan-A), gegen T-Lymphozyten (anti CD3), gegen Makrophagen (anti CD68) sowie der Proliferationsmarker Ki67. Die immunhistochemische Färbung wurde nach Färbeintensität und Anzahl der positiv gefärbten Zellen in einer Skala von 0 bis 3 semiquantitativ beurteilt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem exakten Test nach Fischer sowie dem Mann-Whitney-U-Test sowie mittels einer linearen Diskriminanzanalyse. PAM mit und ohne Atypien unterschieden sich signifikant in ihrem Färbeverhalten für S-100 ($p=0,019$), HMB-45 ($p=0,002$), Melan-A ($p=0,003$), CD3 ($p=0,014$) und CD68 ($p=0,013$). Bindehautmelanome zeigten eine signifikant erhöhte Ki67 Expression ($p=0,015$) sowie signifikant mehr T-Lymphozyten ($p=0,018$) als die PAM mit Atypie. Weiterhin konnten signifikante Unterschiede zwischen Bindehautmelanomen und Bindehautnaevi in ihrem Färbeverhalten für die Marker HMB-45 ($p=0,001$), CD3 ($p=0,016$), CD68 ($p<0,001$) sowie Ki67 ($p=0,007$) nachgewiesen werden.

Die durchgeführte lineare Diskriminanzanalyse zeigte vielversprechende Ergebnisse für eine Kombination der Marker HMB-45, Melan-A und S-100 mit einer Wahrscheinlichkeit von 85,3% für eine korrekte Unterscheidung zwischen PAM mit Atypie und PAM ohne Atypie. Die Kombination von S-100, Ki67 und CD68 erlaubte statistisch in 69,4% eine korrekte Unterscheidung zwischen PAM mit Atypie und Bindehautmelanom. Eine Differenzierung zwischen Bindehautmelanom und Naevus war in 70,1 % der Fälle allein anhand des Markers HMB 45 möglich.

Benigne, potentiell maligne und maligne pigmentierte Bindehauttumoren können neben zytologischen Unterschieden auch anhand ihres immunhistochemischen Färbeverhaltens für melanozytäre und entzündliche Marker unterschieden werden. Die immunhistochemische Untersuchung stellt somit ein wichtiges Instrument in

der Differenzierung histologisch fraglicher Befunde dar. Weitere Studien sind notwendig, um den Stellenwert dieser Marker - einzeln oder in Kombination - in der histopathologischen Routinediagnostik zu definieren.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Schiebler TH, Schmidt W, Zilles K: Anatomie, 8. Auflage, Springer Verlag 1999
2. Naumann GOH: Pathologie des Auges, Berlin-Heidelberg-New York, Springer Verlag 1980, Band 12
3. Damato B, Coupland SE: Conjunctival melanoma and melanosis: a reappraisal of terminology, classification and staging. *Clinical and Experimental Ophthalmology* 2008; 36: 786-95
4. Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 259. Auflage, Berlin, de Gruyter, 2002
5. Masson P: Melanogenic system: nevi and melanomas. *Pathol Annu* 1967; 2: 351-97
6. Folberg R, Jakobiec FA, Bernardino VB et al.: Benign Conjunctival Melanocytic Lesions, Clinicopathologic Features. *Ophthalmology* 1989; 96: 436-61
7. Buckman G, Jakobiec FA, Folberg R, et al.: Melanocytic nevi of the palpebral conjunctiva: an extremely rare location usually signifying melanoma. *Ophthalmology* 1988; 95: 1053-7
8. Shields CL, Shields JA: Tumors of the conjunctiva. *Surv Ophthalmol.* 2004 Jan-Feb; 49(1): 3-24
9. Grin JM, Grant-Kels JM, Grin CM, et al.: Ocular melanomas and melanocytic lesions of the eye. *J Am Acad dermatol.* 1998; 38: 716-30
10. Jakobiec FA, Folberg R, Iwamoto T: Clinicopathologic Characteristics of Premalignant and Malignant Melanocytic Lesions of the Conjunctiva. *Ophthalmology* 1989; 96: 147-66
11. Brownstein S: Malignant Melanoma of the Conjunctiva. *Cancer Control.* 2004 Sep-Oct; 11(5): 310-16
12. Grossniklaus HE, Green WR, Luckenbach M, Chan CC: Conjunctival Lesions in Adults - A Clinical and Histopathologic Review. *Cornea* 1987; 6(2): 78-116
13. Westekemper H, Schallenberg M, Tomaszewsky A et al.: Maligne epibulbäre Tumoren: Neue Strategien in Diagnostik und Therapie, *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2011; 228: 780-92
14. Folberg R, Mc Lean IW, Zimmerman LE: Primary acquired melanosis of the conjunctiva. *Hum Pathol* 1985 Feb; 16(2): 129-35
15. Campbell R J, *Histological Typing of Tumours of the Eye and Its Adnexa.* Berlin, Springer, 1998; 15-20

16. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C (ed): *TNM Classification of Malignant Tumours*. 7th Edition, Wiley-Blackwell, 2009
17. Zimmermann LE, Sobin LH; *Histopathologic Typing of Tumors of the Eye and its Adnexa*, International Histologic Classification of Tumors; Geneva, Zurich: WHO; 1980; 23-24
18. Sugiura M, Colby KA, Mihm MC, Zembowicz A: Low-risk and High-risk Histologic Features in Conjunctival Primary Acquired Melanosis With Atypia: Clinicopathologic Analysis of 29 Cases. *Am J Surg Pathol* 2007 Feb; 31(2): 185-92
19. Folberg R, McLean IW, Zimmerman LE. Conjunctival melanosis and melanoma. *Ophthalmology* 1984; 91: 673-8
20. Shields JA, Shields CL, Mashayekhi A, et al.: Primary acquired melanosis of the conjunctiva: experience with 311 eyes; *Trans Am Ophthalmol Soc*, vol. 105, 2007: 61-72
21. Seregard S.: Conjunctival melanoma: major review. *Surv of Ophthalmol* 1998; 42: 321-50
22. Jakobiec FA: Conjunctival melanoma. *Arch Ophthalmol*. 1980; 98: 1378-84
23. Folberg R: Melanocytic lesions of the conjunctiva. In: Spencer WH. *Ophthalmic Pathology: An Atlas and Textbook*. 4th ed. Philadelphia, Pa: WB Saunders Co; 1996
24. Folberg R, McLean IW, Zimmerman LE. Malignant melanoma of the conjunctiva. *Hum Pathol* 1985; 16: 136-43
25. Esmali B, Wang X, Youssef A, et al.: Patterns of regional and distant metastasis in patients with conjunctival melanoma: experience at a cancer center over four decades. *Ophthalmology* 2001; 108: 2101-2105
26. Tuomaala S, Kivela T: Metastatic pattern and survival in disseminated conjunctival melanoma: Implications for sentinel lymph node biopsy. *Ophthalmology*. 2004; 111: 816-821
27. Silvers D, Jakobiec FA, Freeman T, et al.: Melanoma of the conjunctiva: a clinicopathologic study. In Jakobiec FA (ed): *Ocular and Adnexal Tumors*. Birmingham, Alabama, Aesculapius Publishing Co, 1978; 583-599
28. Paridaens AD, Minassian DC, McCartney AC, et al.: Prognostic factors in primary malignant melanoma of the conjunctiva: a clinicopathological study of 256 cases. *Br J Ophthalmol*. 1994; 78: 252-259
29. Shields CL: Conjunctival melanoma. (Editorial) *Br J Ophthalmol* 2002; 86: 127

30. Shields JA, Shields CL: Melanocytic tumors (of the conjunctiva). Atlas of eyelid and conjunctival tumors. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 1999; 243-66
31. Shields CL, Shields JA, Gunduz K, et al.: Conjunctival melanoma: risk factors for recurrence, exenteration, metastasis, and death in 150 consecutive patients. Arch Ophthalmol 2000; 118: 1497-507
32. Grossniklaus HE, Margo CE, Solomon AR: Indeterminate melanocytic proliferations of the conjunctiva. Arch Ophthalmol. 1999; 117: 1131-36
33. Margo CE, Roper DL, Hidayat AA: Borderline melanocytic tumor of the conjunctiva: diagnostic and therapeutic considerations. J Pediatr Ophthalmol Strabismus. 1991; 28: 268-27
34. Bahrami A, Truong LD, Ro JY: Undifferentiated Tumor, True Identity by Immunohistochemistry. Arch Pathol Lab Med 2008; vol 132: 326-48
35. Ohsie SJ, Sarantopoulos FP, Cochran AJ, Binder SW: Immunohistochemical characteristics of melanoma. J Cutan Pathol 2008; 35: 433-44
36. Heegaard S, Jensen OA, Prause JU: Immunohistochemical diagnosis of malignant melanoma of the conjunctiva and uvea: comparison of the novel antibody against Melan-A with S100 protein and HMB-45; Melanoma Research 2000; 1: 350-54
37. Steuhl K-P, Rohrbach JM, Knorr M: Die Verteilung melanomassoziiierter Antigene (HMB 45 und S100) in benignen und malignen melnozytären Tumoren der Konjunktiva; Klin. Mbl. Augenheilkd. 1991; 199: 187-91
38. Hitzer S, Bialasiewicz AA, Richard G: Immunohistochemische Unterscheidungskriterien für zytoplasmatische Antigene auf erworbenen Melanosen, malignen Melanomen und Naevi der Bindehaut; Klin. Monatsbl. Augenheilkd. 1998; 213: 230-37
39. McDonnell JM, Sun YY, Wagner D: HMB-45 Immunohistochemical staining of Conjunctival Melanocytic Lesions; Ophthalmology 1991; 98: 453-58
40. Wick MR, Swanson PE, Rocamora A: Recognition of malignant melanoma by monoclonal antibody HMB-45. An immunohistochemical study of 200 paraffin-embedded cutaneous tumors. J Cutan Pathol 1988; 15: 201-07
41. Gown AM, Vogel AM, Hoak D, Gough F, McNutt MA: Monoclonal antibodies specific for melanocytic tumors distinguish subpopulations of melanocytes. Am J Pathol 1986; 123: 195-203
42. Sharara NA, Alexander RA, Luthert PJ et al.: Differential immunoreactivity of melanocytic lesions of the conjunctiva. Histopathology 2001; 39: 426-431
43. Jungbluth AA, Busam K, Gerald WL et al.: A103: An Anti-Melan-A monoclonal Antibody for the Detection of Malignant Melanoma in Paraffin-

- Embedded Tissues. *Am J Surg Pathol* 1998; 22(5): 595-602
44. Fetsch PA, Marincola FM, Abati A: The new melanoma markers: MART-1 and Melan-A (the NIH experience). *Am J Surg Pathol* 1999; 23(5): 607-10
45. Busam KJ, Jungbluth AA Melan-A, a new melanocytic differentiation marker. *Adv Anat Pathol* 1999; 6(1): 12-8
46. Büttner R, Thomas C (Hrsg.): *Allgemeine Pathologie*, 2. Auflage, Schattauer Verlag Stuttgart New York, 2001
47. Anastassiou G, Esser M, Bader E, Steuhl KP, Bornfeld N: Expression of cell adhesion molecules and tumor infiltrating leucocytes in conjunctival melanoma. *Melanoma Res.* 2004; 14(5): 381-5
48. Messmer EM, Mackert MJ, Zapp DM et al.: In vivo confocal microscopy of pigmented conjunctival tumors. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2006; 244: 1437-45
49. Gerdes J, Lemke H, Baisch H et al.: Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984; 133: 1710-5
50. Nakane P, Pierce G: Enzyme labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. *J Histochem and Cytochem* 1966; 14: 929-31
51. Robinson G, Dawson I: Immunohistochemical studies of the endocrine cells of the gastrointestinal tract II. An immunoperoxidase technique for the localization of secretin-containing cells in human duodenum. *J Clin Pathol* 1975; 28: 631-35
52. Eagle Jr RC: Immunohistochemistry in diagnostic ophthalmic pathology: a review. *Clinical and Experimental Ophthalmology* 2008; 36: 675-88
53. Idikio HA: Immunohistochemistry in diagnostic surgical pathology: contributions of protein lifecycle, use of evidence-based methods and data normalization on interpretation of immunohistochemical stains. *Int J Clin Exp Pathol* 2010; 3(2): 169-76
54. Bussolati G, Leonardo E: Technical pitfalls potentially affecting diagnoses in immunohistochemistry. *J Clin Pathol* 2008; 61: 1184-92
55. Coindre JM, Tanguy F, Merlio JP, De Mascarel I, De Mascarel A, Trojani M: The value of Immunohistological techniques in undifferentiated cancers. *Tumori.* 1986; 72: 539-44
56. Gatter KC, Alcock D, Heryet A, Mason DY: Clinical importance of analyzing malignant tumours of uncertain origin with immunohistological techniques. *Lancet* 1985; 1: 1302-05
57. Vege DS, Soman CS, Joshi UA, Ganesh G, Yadav JN: Undifferentiated

- tumors: an immunohistochemical analysis on biopsies. *J Surg Oncol.* 1994; 57: 273-76
58. Dabbs DJ: *Diagnostic immunohistochemistry.* Philadelphia, Churchill Livingstone, 2002
59. Cochran AJ, Wen DR: S-100 protein as a marker for melanocytic and other tumours. *Pathology* 1985; 17: 340
60. Schmitt FC, Bacchi CE: S-100 protein: is it useful as a tumour marker in diagnostic immunocytochemistry? *Histopathology* 1989; 15: 281
61. Herrera GA, Turbat-Herrera EA, Lott RL: S-100 protein expression by primary and metastatic adenocarcinomas. *Am J Clin Pathol.* 1988; 89: 168-76
62. Keijser S, Missotten GS, Bonfrer JM et al.: Immunophenotypic markers to differentiate between benign and malignant melanocytic lesions. *Br J Ophthalmol* 2006; 90: 213-17
63. Jakobiec FA, Bhat P, Colby KA: Immunohistochemical Studies of Conjunctival Nevi and Melanomas. *Arch Ophthalmol.* 2010; 128(2): 174-83
64. Jakobiec FA, Colby KA, Bajart AM et al.: Immunohistochemical Studies of Atypical Conjunctival Melanocytic Nevi. *Arch Ophthalmol.* 2009; 127(8): 970-80
65. Smoller BR, Mc Nutts NS, Hsu A: HMB-45 recognizes stimulated melanocytes. *J Cutan Pathol* 1989; 16: 49-53
66. Wick MR, Swanson PE, Rocamora A: Recognition of malignant melanoma by monoclonal antibody HMB-45. An immunohistochemical study of 200 paraffin-embedded cutaneous tumors. *J Cutan Pathol* 1988; 15: 201-07
67. Glasgow BJ, McCall LC, Foos RY: HMB-45 Antibody Reactivity in Pigmented Lesions of the Conjunctiva. *Am J Ophthalmol* 1990 Jun 15; 109(6): 696-700
68. Messmer EM, Grenot UB, Kampik A: Immunohistochemical Differentiation of Melanocytic Conjunctival Tumors. *ARVO Annual Meeting Abstract* April 2009, vol.50, 4281.doi
69. Li LX, Crotty KA, Mc Carthy SW et al.: A zonal comparison of MIBI-Ki 67 immunoreactivity in benign and malignant melanocytic lesions. *Am J Dermatopathol* 2000; 22(6): 489-95
70. Lohmann CM, Iversen K, Jungbluth AA et al.: Expression of melanocyte differentiation antigens and Ki 67 in nodal nevi and comparison of Ki-67 expression with metastatic melanoma. *Am J Surg Pathol* 2002; 26(10): 1351-7
71. Chowers I, Livni N, Solomon A et al.: MIB-1 and PC-10 immunostaining for the assessment of proliferative activity in primary acquired melanosis without

- and with atypia. Br J Ophthalmol 1998; 82: 1316-19
72. Uguen A, Talagas M, Costa S et al.: A p16-Ki67-HMB-45 immunohistochemistry scoring system as an ancillary diagnostic tool in the diagnosis of melanoma. Diagnostic Pathology 2015; 10: 195
73. Nielsen PS, Riber-Hansen R, Steiniche T: Immunohistochemical double stains against Ki 67/MART-1 and HMB45/MITF: promising diagnostic tools in melanocytic lesions. Am J Dermatopathol. 2011; 33(4): 361-70

IX. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. med. Anselm Kampik, ehemaliger Direktor der Augenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, der mir im Rahmen meiner klinischen und wissenschaftlichen Tätigkeit unter seiner Leitung die Möglichkeit gegeben hat, mir die Augenheilkunde in ihrem breiten Spektrum zu erschließen und die Histologie als eine Tür zum grundlegenden Verständnis von Krankheitsbildern für mich zu entdecken.

Frau Prof. Dr. med. Elisabeth Messmer, Oberärztin und Leiterin der histologischen Abteilung der Augenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die Themenstellung und intensive Betreuung während dieser Arbeit, für ihre Geduld und den stetigen Ansporn. Insbesondere jedoch für die Einführung in die faszinierende Welt der ophthalmologischen Histologie, für ihre individuelle Förderung und Vermittlung der Leidenschaft für die wissenschaftliche Arbeit.

Frau Annette Serbin und Frau Angelika Pressler, medizinisch-technische Laboratoriumsassistentinnen der histologischen Abteilung der Augenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die Unterstützung beim praktischen Teil dieser Arbeit und technischen Fragestellungen sowie die gute Zusammenarbeit im täglichen Betrieb der histologischen Abteilung.

Herrn Dr. Markus Schaumberger, für seine Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten.

Herrn Harald Kröhn für die Bildbearbeitung der Diagramme.

Meiner Mutter, Frau Urd Reime, deren bedingungslose Liebe und Glaube an mich das Fundament meiner persönlichen und beruflichen Entwicklung sind.

Meiner Schwester Susanne für ihre immerwährende Unterstützung und Liebe, für unsere innige Verbundenheit in allen Lebenslagen.

Und insbesondere meinem Mann Thomas und meinen Kindern Cléa und Matisse, die mein Leben mit ihrem Licht erhellen.

Eidesstattliche Versicherung

Grenot, Ulrike Barbara

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Immunhistochemische Differenzierung melanozytärer Bindehauttumoren

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Nürnberg, 18.12.2017

Ort, Datum

Ulrike Grenot

Unterschrift Doktorandin/Doktorand